

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة المسيلة

UNIVERSITE DE M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE



MÉMOIRE DE MASTER ACADEMIQUE

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : ANALYSES BIOCHIMIQUES

Présenté par

Naoual BELHOUT

Thème :

**ACTINOMYCETES SAHARIENS PRODUCTEURS D'ANTIFONGIQUES:
TAXONOMIE ET ETUDE DES ANTIBIOTIQUES**

DEVANT LE JURY :

MEDJEKAL Samir

MAA

Président

TOUMATIA Omrane

MAA

Encadreur

HENDEL Noui

MAA

Examineur

BENKHALED Abdelrrahim

MAA

Examineur

Promotion: 2012-2013

SOMMAIRE

Avant-propos

Index des figures

Index des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

INTRODUCTION GENERALE 01

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.- LES ACTINOMYCETES	04
1.- Caractéristiques morphologiques des actinomycètes	04
2.- Ecologie	04
3.- Importance des actinomycetes	05
3.1.- Importance dans les domaines pharmaceutique, médical et vétérinaire	05
3.2.- Importance dans le domaine agronomique	06
3.3.-Divers autres rôles	07
4.- Taxonomie des actinomycètes	07
4.1.- Critères actuels d'identification	07
4.1.1.- Critères morphologiques	07
4.1.1.2.- Caractéristiques culturelles	07
4.1.1.3.- Caractéristiques micromorphologiques	07
4.2.- Classification chimiotaxonomique	09
4.2.1.- Les acides aminés	09
4.2.2.- Les sucres	09
4.2.3.- Les lipides	11
4.2.3.1.- Les phospholipides	11
4.2.3.2.- Les acides mycoliques	11
4.2.3.3.- Les ménaquinones	12
4.2.3.4.- Les acides gras	12
4.3.- Critères physiologiques et taxonomie numérique	12

4.3.1.- Tests physiologiques	12
4.3.2.-Taxonomie numérique	12
4.4. - Critères moléculaires	13
4.4.1.- Etude de l'ARN ribosomique (ARNr)	13
4.4.2.- Hybridation ADN-ADN	13
4.4.3.- Pourcentage de guanine - cytosine (G + C)	14
4.5.- Le genre <i>Streptomyces</i>	14
II.- LES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES	15
1.- Généralités sur les antibiotiques	15
2.- Classification des antibiotiques	15
3.- Mode d'action des antibiotiques	16
4.- Biosynthèse, purification et détermination des structures des antibiotiques	17
4.1.- Biosynthèse	17
4.2.- Purification	19
4.3.- Détermination des structures chimiques des antibiotiques	20

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I.- ORIGINE DES SOLS ET MATERIEL BIOLOGIQUE	23
1.- Echantillons de sols	23
2.- Les souches de microorganismes-cibles	23
II.- ISOLEMENT DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES	23
1.- Milieu d'isolement	23
2.- Agents sélectifs	23
3.- Ensemencement et incubation des actinomycètes	23
4.- Reconnaissance des actinomycètes	24
5.- Purification et conservation	24
1.- Choix des souches	24
2.- Etude morphologique	24
2.1.- Macromorphologie	24
3.- Analyse des constituants cellulaires	24
3.1.- Obtention de la biomasse mycélienne	25
3.2.- Analyse des acides aminés pariétaux	25
3.3.- Analyse des sucres cellulaires	25
3.4.- Analyse des phospholipides membranaires	26

4.- Etude physiologique	26
4.1.- Production de pigments mélanoides	27
4.2.- Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone	27
4.3.- Dégradation de divers autres composés organiques	27
4.4.- Tests de sensibilité aux antibiotiques et au NaCl	27
5.- Etude moléculaire	27
5.1.- Extraction de l'ADN génomique	27
5.2. Quantification de l'ADN	28
5.3. Electrophorèse sur gel d'agarose	28
5.4.- Amplification par PCR	29
5.5.- Séquençage de l'ADNr 16S	29
5.6.- Analyses phylogénétiques	30
IV.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES	32
1.- Protocole général d'étude des antibiotiques	32
2.- Les isolats d'actinomycètes	32
3.- Technique des stries croisées	33
4.- Cinétique de production et détection des antibiotiques en milieux liquides	33
4.1.- Milieux de culture	33
4.2.- Pré-cultures	33
4.3.- Cinétique de production des antibiotiques	33
5.- Extraction des antibiotiques	34
5.1.- Extraction à partir du filtrat de culture	34
5.2.- Extraction à partir du mycélium	34
6.- Tests d'antibiographie	35
7.- Révélations microbiologiques et chimiques des antibiotiques	35
7.1.- Préparation des plaques de gel de silice	35
7.2.- Dépôt des échantillons et développement des plaques	35
7.3.- Révélations microbiologiques des antibiotiques: bioautographies	36
7.4.- Révélations chimiques des antibiotiques	36
8.2.- Sur plaques épaisses de gel de silice	36
8.- Semi-purification des antibiotiques	36
8.1.- Par chromatographie sur colonne de gel de séphadex LH-20	37
8.2.- Sur plaques épaisses de gel de silice	37
9.- Etude de la stabilité de l'activité antibiotique	37
9.1.- Stabilité en fonction du pH	38
9.2.- Stabilité en fonction de la température	38

9.3.- Stabilité à la lumière	38
10.- Purification par HPLC	38
11.- Etudes spectroscopiques des antibiotiques	39
11.1.- Spectroscopie UV-visible	39
11.2.- Spectrométrie de masse	39

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE I

ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES DES SOLS SAHARIENS ET EVALUATION DE LEUR POTENTIEL ANTIFONGIQUE

I.- ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES	40
II.- EVALUATION DU POTENTIEL ANTIMICROBIEN	40
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION	42

PARTIE II

ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES SELECTIONNES

I.- ETUDE MORPHOLOGIQUE	45
1.- Caractéristiques culturelles	45
2.- Caractéristiques micromorphologiques	45
II.- ETUDE CHIMIOTAXONOMIQUE	48
III.- ETUDE PHYSIOLOGIQUE	48
1.- Isolat AA1	48
2.- Isolats D5, D54, D22 et B31	48
IV.- ETUDE MOLECULAIRE DES ISOLATS	50
V.- DISCUSSION ET CONCLUSION	54

PARTIE III
PRODUCTION, EXTRACTION, PURIFICATION
ET CARACTERISATION DES ANTIBIOTIQUES

I. CINETIQUES DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT AA1	56
1.- Résultats	56
4.- Discussion et conclusion	58
III.- EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE AA1	60
1.- Production, extraction, détection et purification des antibiotiques de l'isolat AA1	60
1.1.- Production des molécules actives de l'isolat AA1 en fioles d'Erlenmeyer	60
1.2.- Extraction des antibiotiques	60
1.2.1.- Extraction à partir du mycélium	60
1.2.2.- Extraction des activités à partir du filtrat de culture et tests d'antibiogramme	60
4.- Discussion et conclusion	63
IV.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT AA1	63
1.- Détection des antibiotiques	63
1.1.- Détection des polyènes par spectroscopie UV-visible	63
1.2.- Détection des antibiotiques par bioautographie	64
1.2.1.- Chromatographie analytique sur couche mince	64
1.2.2.- Révélation microbiologiques: bioautographies	64
1.3.- Détection des antibiotiques par révélation chimique	65
2.- Purification de l'antibiotique YA	65
2.1.- Semi-purification	66
2.2.- Purification de l'antibiotique YA par HPLC	67
3.- Caractérisation spectroscopique de l'antibiotique YA	67
3.1.- Spectroscopie UV-visible	67
3.2.- Spectroscopie de masse	68
4.- Etude de la stabilité de l'activité antifongique de YA	69
4.1.- Effet du pH.	69
4.2.- Effet de la température	69
4.3.- Effet de la lumière	69
5.- Discussion et conclusion	70

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	76
ANNEXES	86

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que dieu les protège et leur donne la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

*A mes chers sœurs : Djamila et Abba et Fatna;
Je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.*

*A mes chers frères surtout docteur Mohammed.
A tous mes amies, surtout Razika, Asma et Afaf, Hala.
A tous mes collègues de la promotion, surtout Siham et Imen,
Hicham.*

A tous ceux que j'aime.

Om youcef

J'exprime tout d'abord, mes profonds remerciements et louanges à **ALLAH** tout puissant, qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale supérieure dirigé par le professeur Nasseridine SABAOU. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir donné la chance de faire ce mémoire ainsi que pour son soutien constant durant toute la période passée au laboratoire.

Le travail présenté a été dirigé par M. Omrane TOUMATIA, maître assistant A. Sa culture pluridisciplinaire et sa bonne humeur constante ont été d'un grand secours pour surmonter certains des moments difficiles de ce mémoire. Qu'il en soit vivement remercié.

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements au monsieur Mounir MEDJEKAL Samir maître assistant à l'université de M'sila, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.

Je tiens à remercier également les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger et de corriger ce travail. Que Messieurs BENKHALED Abdelrahim, HENDEL Noui trouvent ici toute ma reconnaissance pour en avoir été les examinateurs.

J'adresse mes vifs remerciements aux docteurs, Messieurs à tous les membres du LBSM de l'ENS de Kouba : M. BOURAS et YEKKOUR et Mme ATIKA; à mes amis de post-graduation de l'ENS: Khaoula, Afaf, Samira, Fouzia, Abdelhadi, et Hocine et surtout Guendouz pour leur aide.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à ma chère HALA qui m'a bien accompagné pendant ce travail par son aide, ses conseils et ses encouragements.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

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

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes	6
Figure 2. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes	10
Figure 3. Chronologie de la découverte des différentes classes d'antibiotiques et leur introduction en clinique.	15
Figure 4. Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques	17
Figure 5. Exemple de protocole général de purification des antibiotiques.	21
Figure 6. Fenêtre du serveur EzTaxon 2.1 montrant un blast de séquence.	30
Figure 7. Fenêtre du logiciel MEGA 5.05 avec l'explorateur de l'alignement des séquences.	31
PDF created	
Figure 8. Protocole général montrant l'isolement, les tests d'antagonisme, les études des antibiotiques et les essais de lutte contre les maladies des plantes par les isolats d'actinomycètes	32
Figure 9. ISP2Activité antifongique de la souche AA1 sur milieu	42
Figure 10. ISP2Macromorphologie des isolats d'actinomycètes étudiés.	47
Figure 11. Micromorphologie (G: x 40) des isolats AA1 et B31 respectivement sur milieu	48
Figure 12. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat AA1 et les souches-types des espèces du genre <i>Streptomyces</i> les plus proches.	51
Figure 13. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat D5 et les souches-types des espèces du genre <i>Streptomyces</i> les plus proches.	52
Figure 14. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat D22 et les souches-types des espèces du genre <i>Streptomyces</i> les plus proches.	53
Figure 15. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat D54 et les souches-types des espèces du genre <i>Streptomyces</i> les plus proches.	53
Figure 16. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les quatre isolats : AA1, D5, D22 et D54 et les souches-types des espèces du genre <i>Streptomyces</i> les plus proches.	54
Figure 17. Cinétiques de croissance et de pH de la souche AA1 dans les milieux ISP2 et Bennett.	57
Figure 18. Cinétiques de l'activité antibiotique contre <i>Mucor ramannianus</i> .	57
Figure 19. Activité antibiotique de la souche AA1 (méthode des puits) contre <i>Fusarium</i>	

<i>oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> , <i>Mucor ramannianus</i> et <i>Bacillus subtilis</i> .	58
Figure 20. Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques de l'isolat AA1.	61
Figure 21. Activité antimicrobienne des extraits organiques du filtrat de culture de l'isolat AA1 en milieu ISP2.	62
Figure 22. Révélation par antibiographie des activités antibiotiques des extraits organiques du filtrat de culture de l'isolat AA1.	62
Figure 23. Spectre d'absorption dans l'UV-visible de extrait butanolique brut de la souche AA1 cultivée en milieu ISP2.	64
Figure 24. Localisation par bioautographie des activités de l'extrait butanolique du filtrat de culture de la souche AA1 cultivée sur ISP2.	65
Figure 25. Profil d'élution en HPLC de la première injection de YA purifié précédemment par séphadex LH-20 et par CCM.	67
Figure 26. Spectre d'absorption dans l'UV	68
Figure 27. Spectre de masse obtenu par Nano-ESI-MS de l'antibiotique YA.	68
Figure 28. Effet des facteurs physico-chimiques sur l'activité antifongique de l'antibiotique YA.	69
Figure 29. Structure chimique de l'actinomycine D	71

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1.	Habitats de certains actinomycètes.	5
Tableau 2.	Les taxa de l'ordre des Actinomycetales	8
Tableau 3.	Principaux chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes	11
Tableau 4.	Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes	11
Tableau 5.	Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique	16
Tableau 6.	Programme du gradient d'éluion par HPLC	39
Tableau 7.	Action d'antagonisme des souches d'actinomycètes.	41
Tableau 8.	Caractéristiques culturales de' isolat AA1 D5, D22, D54 et B31	46
Tableau 9.	Caractéristiques physiologiques d'isolats AA1	49
Tableau 10.	Caractéristiques physiologiques des isolats D5, D22, D54 et B31.	50
Tableau 11.	Résultat du blast de la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat AA1 avec celles des souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i> .	51
Tableau 12	Position taxonomique des isolats d'actinomycètes selon les séquences de l'ADNr 16S.	52

LISTE DES ABREVIATIONS

ATTC	American Type Culture collection
Bn	Bennett
BLAST	Basic Local Aligement Search Tool
CCM	chromatographie sur couche mince
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
ISP2	International <i>Streptomyces</i> Project n° 2
IR	Infra Rouge
GN	Gélose Nutritive
G.s.s	Gramme de sol sec
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Mycélium du substrat
MEGA5	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDA	Potato-Dextrose-Agar
PS	Pigment soluble
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rpm	Rotation par minute
SM	spectre de mass
UV-visible	Ultraviolet-visible

RESUME

Cette étude concerne l'isolement, la taxonomie et les antibiotiques antifongiques des actinomycètes d'origine saharienne. Pour cela, 85 isolats ont été collectés à partir de 14 échantillons de sols sahariens et ont fait l'objet d'une étude préliminaire de classification sur la base de leur morphologie et également d'une évaluation de leurs propriétés antifongiques.

Les cinq meilleurs isolats, nommés AA1, D54, D5, D22 et B31 ont été retenus pour des études plus approfondies. L'étude taxonomique basée sur les caractéristiques culturelles, micromorphologiques et chimiques (analyse des constituants cellulaires en acides aminés, en sucres et en phospholipides) a permis de rattacher les cinq isolats au genre *Streptomyces*. Sur la base des analyses physiologiques et surtout moléculaires (PCR et séquençage de l'ADN ribosomique 16S, phylogénie), la meilleure souche antagoniste AA1 a été rapprochée de l'espèce *Streptomyces mutabilis* avec un taux de ressemblance de 99,93%. L'isolat D54 a été rapproché de l'espèce *S. griseoplanus*, les isolats D22 et D5 ont été rapprochés de l'espèce *Streptomyces cyaneofuscatus*.

Parmi ces cinq isolats, AA1 a été sélectionné sur la base de leur propriété antagoniste intéressante, particulièrement vis-à-vis de champignons filamenteux pathogènes. Des cinétiques de production des antibiotiques en milieux ISP2 et Bennett liquides ont montré la présence de trois maxima suggérant la sécrétion de plusieurs composés bioactifs. Les bioautographies de l'extrait butanolique du filtrat de culture ont permis de déceler quatre fractions actives dont l'une, de couleur jaune orangé (notée YA = 'yellow antibiotic'), possède une action puissante contre plusieurs champignons.

La purification par HPLC a montré que YA se compose d'un seul antibiotique. Les études spectroscopiques (UV-visible et spectrométrie de masse) montrent que cet antifongique est de nature non polyénique ayant un poids moléculaire de 1254. L'antibiotique YA est relativement stable vis-à-vis du pH, de la température et de la lumière.

Mots clés: sols sahariens, actinomycètes, *Streptomyces*, taxonomie, propriétés antagonistes, antibiotiques.

ABSTRACT

The goals of this study are the isolation, the taxonomy of Saharan actinomycetes, and the study of the antifungal compounds produced by these actinomycetes. For that, 85 strains were isolated from 14 different samples of Saharan soils. These strains were the subject of a preliminary study of classification on the basis of morphology and antifungal properties.

Five selected isolates, named AA1, D5, D22, D54 and B31, were retained for detailed studies. The taxonomic study on the basis of morphological and chemical criteria (analyses of cellular components such as amino-acids, sugars and phospholipides) showed that the five isolates belonging to the genus *Streptomyces*. The physiological and especially the molecular analysis (PCR and sequencing of the ribosomal DNA 16S, and phylogeny), showed that the best antagonistic strain AA1 was most closely related to *Streptomyces mutabilis* with 99.93% identity. The isolate D54 was brought closer to the species *S. griseoplanus*, the isolates D22 and D5 was brought closer to the species *S. cyaneofuscatus*.

Among these five isolates, AA1 was selected on the basis of their interesting antagonistic properties. This strain has a broad range of activity against the fungi. The kinetics of production of antibiotics realized in liquid media ISP2 and Bennett showed the presence of three maxima of antifungal activity, indicating the production of several antibiotic complexes. The bioautography of the butanolic extract of the culture filtrate showed four active fractions. One fraction of yellow orange color named YA (noted YA = 'yellow antibiotic') has a powerful activity against several pathogenic fungi.

The purification by HPLC showed that YA is composed of only one antibiotic. The spectroscopic studies (UV-visible and mass spectrometry) showed that this antifungal having a molecular weight of 1254 is not a polyenic nature. The Antibiotic YA is relatively stable with respect to the pH, to the temperature and the light.

Key words: Saharan soils, actinomycetes, *Streptomyces*, taxonomy, antagonistic properties, antibiotics.

يخص هذا العمل العزل و الدراسة التصنيفية للبكتيريا الهيفية من أصل صحراوي و لمضاداتها الفطرية. لذلك تم جمع 85 عزلة انطلاقا من 14 عينة لأتربة صحراوية، خضعت لتشخيص أولي اعتمادا على خصائصها المظهرية و كذلك لتقييم قدراتها التضادية مع الفطريات، و تبعا لذلك تم انتقاء أحسن العزلات المضادة، المسماة AA1، D5، D22، D54 و B31 لدراستها بشكل أعمق. سمحت الدراسة التصنيفية المعتمدة على كل من الخصائص الإستباتية، الخصائص الشكلية الدقيقة و الخصائص البنيوية الكيميائية تحليل المكونات الخلوية من حيث الأحماض الأمينية، السكريات و الفوسفوليبيدات) بإلحاقها بالجنس *Streptomyces*، كما مكنت التحاليل الفيزيولوجية و خاصة الجزئية (التفاعل التسلسلي البوليمري PCR، تحديد تسلسل ADN الريبوزومي 16S و الدراسة الوراثية (phylogénie)) من تقريب AA1 و هي أحسن العزلات نشاطا، بالنوع *Streptomyces mutabilis* بنسبة تشابه قدرها 99,93%. تم إلحاق العزلة D54 بالنوع *S. griseoplanus*، العزلتين D22 و D54 بالنوع *S. cyaneofuscatus*. من بين هذه العزلات الخمس، تتميز السلالة AA1 بنشاط يشمل عدد كبير من الفطريات الممرضة، ووفقا للدراسات الخاصة بحركية إنتاجها للمضادات الحيوية في مرقى الإستنبات ISP2 و Bennett، سجلت ثلاث ذروات للنشاط ضد الفطريات، ما يؤكده إفرازها لعدة معقدات فعالة.

أظهرت تجارب الكشف الحيوي (bioautographie) لمستخلص *n*-butanol من رشاحة الإستنبات، احتواءه على أربع أجزاء فعالة ضد معظم الفطريات، تتميز إحداها بلون أصفر برتقالي (المسماة YA=yellow antibiotic)، وهي جد مثبطة ويشمل نشاطها عديد الفطريات الممرضة.

تبين بعد معالجة و تنقية المعقد YA بالكروماتوغرافيا السائلة فائقة التحلية (HPLC) بأنه يحتوي على مضاد حيوي واحد. أظهرت الدراسات الطيفية (الطيف فوق البنفسجي- المرئي و طيف الكتلة) بأن هذا المضاد الفطري لا يحتوي روابط هيدروجينية مزدوجة، ذو وزن جزيئي 1254، يتميز هذا المضاد الحيوي YA باستقرار نسبي جيد في مختلف الظروف من درجات الحموضة، الإضاءة و الحرارة.

الكلمات المفتاحية: أتربة صحراوية، بكتيريا هيفية، *Streptomyces*، تصنيف، خصائص تضادية، مضادات حيوية.

Introduction Générale

La taxonomie bactérienne, qui se définit comme l'étude des relations qui existent entre les bactéries, englobe leur classification, leur nomenclature et leur identification (Prescott et *al.*, 2002). Ces trois parties consistent à établir des taxa bactériens présentant des caractères communs, qui devront être nommés et identifiés sur la base de critères définis. Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, cette classification bactérienne est en perpétuel bouleversement, notamment au sein des bactéries anaérobies, groupe encore mal connu de par la lourdeur et la difficulté de culture. Ces dernières années en vu la création de très nombreuses nouvelles espèces, de nouveaux genres et même de nouvelles familles, ordres voire classes de bactéries anaérobies (Euzéby, 2013). Par ailleurs, l'utilisation d'outils plus performants a mené à la reclassification d'espèces ou de genres déjà connus et de nombreux grands remaniements taxonomiques restent à venir.

Les actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif, sont en général saprophytes, hétérotrophes, aérobies à microaérophiles et mésophiles (ou parfois thermophiles) (Goodfellow et Williams, 1983; Kämpfer, 2006). Leur grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales et leur grande variabilité métabolique leur a permis d'être répandus à l'échelle universelle dans presque tous les écosystèmes, avec toutefois une certaine préférence pour les sols (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983).

L'intérêt des actinomycètes dans les différents domaines est d'une grande importance. En effet, ils sont très utiles dans la biodégradation de la matière organique et le recyclage des éléments dans les sols et interviennent dans la lutte biologique contre les maladies des plantes, grâce à leur grande aptitude à produire différentes substances inhibitrices vis-à-vis des autres microorganismes telluriques (Goodfellow et Williams, 1983).

Ils sont utilisés dans de nombreux processus biotechnologiques pour la production d'enzymes, de vitamines, d'immunostimulants, d'immunosuppresseurs, de substances vasodilatatrices et anticholestérolémiques, d'antihistaminiques, d'anticancéreux, etc. (Umezawa, 1988). Cependant, les actinomycètes sont surtout connus pour leur grande faculté à produire des antibiotiques, avec plus de 70 % des substances actives d'origine microbienne (Berdy, 2005) et en particulier le genre *Streptomyces* qui produit à lui seul la majorité de ces antibiotiques.

Même si la production mondiale des antibiotiques satisfait les besoins actuels en thérapeutique, la recherche de nouvelles molécules actives reste l'une des priorités, surtout avec la prolifération des souches pathogènes résistantes aux antibiotiques disponibles sur le marché mondial (Peignen, 1995; Rousson, 1996; Decre et Courvalin, 1997; Bryskier, 1999). Les microorganismes et les extraits végétaux ont été à cet effet largement exploités (Gupte *et al.*,

2002). Aujourd'hui, l'une des stratégies utilisées est d'explorer les écosystèmes particuliers, souvent ignorés par le passé, avec une variété de nouvelles cibles (Cragg *et al.*, 1997; Von Dohren et Grafe, 1997; Hegde *et al.*, 2001; Phoebe *et al.*, 2001). Ainsi, beaucoup de travaux s'intéressent actuellement à l'étude des microorganismes "extrêmophiles" provenant d'échantillons de sols prélevés dans des endroits très hostiles, comme les profondeurs des mers, les régions glacières, les sols des déserts, les sols salés et alcalins, etc. En effet, l'adaptation écologique et la survie des microorganismes aux conditions environnementales hostiles impliquent souvent des voies métaboliques non communes et particulières, ce qui favorise l'obtention de nouveaux métabolites secondaires.

Pour favoriser la sélection des actinomycètes et en particulier des genres très faiblement représentés dans les sols, plusieurs méthodes ont été utilisées, dont les plus classiques sont les procédés de formulation de milieux de culture spécifiques. Ces procédés sont souvent basés sur des composés nutritifs particulièrement favorables à ces genres et amendés en substances inhibant les microorganismes indésirables (Steele et Stowers, 1991). Toutes ces stratégies ont permis la découverte de nombreux genres et espèces nouveaux et également plusieurs substances originales dont des antibiotiques.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation du potentiel actinomycétal en vue d'une utilisation dans le traitement des maladies fongiques chez l'humain et les végétaux. En effet, nous nous sommes intéressés aux isolats d'actinomycètes provenant de sols sahariens et présentant un potentiel antagoniste intéressant. Pour cela, l'efficacité de la meilleure souche d'actinomycète (sélectionnée parmi 85 souches) productrice d'antibiotiques antifongiques, été étudiée.

Dans le présent mémoire nous nous sommes fixés comme objectif d'isoler les souches d'actinomycètes, de sélectionner et de déterminer les meilleures souches actives contre des champignons pathogènes, de les identifier et d'étudier les antibiotiques produits par la meilleure souche antagoniste.

Ce travail est présenté en trois chapitres:

- Le premier chapitre est relatif à une synthèse bibliographique en rapport avec le thème abordé.
- Le deuxième chapitre est consacré à la présentation du matériel utilisé et à la description des méthodes effectuées.
- Le troisième chapitre comporte les résultats et discussions lesquels sont présentés en quatre parties:

. La première partie est relative à l'isolement des actinomycètes des sols sahariens et l'évaluation de leur potentiel antifongique et antibactérien

. La deuxième partie concerne l'étude taxonomique des souches d'actinomycètes sélectionnées (identification morphologique, chimique, physiologique et moléculaire basée sur la PCR, séquençage de l'ADNr 16S et la phylogénie).

. La troisième partie est en rapport avec la production, l'extraction, la purification et la caractérisation des antibiotiques sécrétées par les actinomycètes.

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.- LES ACTINOMYCETES

1.- Caractéristiques morphologiques des actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées. Ainsi, les actinobactéries sont définies comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un taux élevé en guanine + cytosine (G + C) dans leur patrimoine génétique (supérieur à 55 %) (Kämpfer, 2006; Nanjwad *et al.*, 2010). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable, elle va de formes peu évoluées comme *Mycobacterium*, à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (Smaoui, 2010).

Les actinomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons primitifs, du fait de leur mycélium, souvent à la fois aérien et pénétrant dans le substrat nutritif, du fait également de la fructification par sporanges libérant des spores chez nombre d'entre eux (Hasley et Leclerc, 1993; Horinouchi, 2002).

Leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries (Mariat et Sebald, 1990). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitage par des bactériophages, leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens) ne permet pas de les classer parmi les mycètes (Hasley et Leclerc, 1993 in Loucif, 2011).

2.- Ecologie

Les actinomycètes sont très répandus dans la nature. Ils sont plus fréquents dans le sol et dans le compost végétal, et se retrouvent également dans les fumiers, au fond des lacs et des rivières, dans les produits alimentaires, où ils peuvent causer leur détérioration, et dans l'air. Les actinomycètes ont été isolés de l'eau de mer et de la boue du fond de la mer, bien que la mer ne semble pas être un habitat favorable pour eux. Certaines espèces de *Streptomyces* et de *Nocardia*, sont des parasites des plantes et des animaux.

Certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats par rapport à d'autres, quelques exemples sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Habitats de certains actinomycètes (Grigorova et Norris, 1990).

Actinomycètes	Habitats
<i>Actinoplanes</i>	L'eau douce, la litière végétale, le sol.
<i>Frankia.</i>	Les nodules racinaires des non-légumineuses.
<i>Micromonospora</i>	L'eau douce, les sédiments, les sols humides.
<i>Nocardia amarae</i>	Les boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Les déjections animales, l'eau, le sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin.
<i>Streptomyces</i>	Le sol, la litière végétale, l'eau.
<i>Thermoactinomyces</i>	Le compost.

3.- IMPORTANCE DES ACTINOMYCETES

3.1.- Importance dans les domaines pharmaceutique, médical et vétérinaire

Les actinomycètes sont les producteurs d'antibiotiques les plus efficaces du monde vivant. Plus des deux tiers des quelques six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par cet ordre de bactéries -actinomycine, streptomycine, néomycine, candididine, etc. (Lazzarini et al. 2000; Berdy, 2005).

Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinomycètes. Elles sont déjà utilisées en industrie agro-alimentaire (ex.: glucose isomérases), en thérapeutique (cholestérol oxydases), en vétérinaire, comme additif nutritionnel pour l'élevage (Oestergraard *et al.*, 2001) ou encore en industrie chimique, avec addition des protéases aux détergents (Moreira, 2002). Des antiviraux (Kim *et al.*, 1998), des substances utilisées en neurothérapie (trouble du système nerveux central et dégénérescence des neurones) (Murakata *et al.*, 1998; Eder *et al.*, 2002), des immunosuppresseurs (utilisés dans la transplantation des organes) (Umezawa, 1988), des antihistaminiques (Kase *et al.*, 1986; Ohmori *et al.*, 1988), etc., sont également produits. Non seulement les actinomycètes sont une riche source d'enzymes mais, inversement, ils produisent aussi de nombreux inhibiteurs d'enzymes (Imada, 2005).

Près de 20% des antibiotiques sécrétés par les streptomycètes ont un pouvoir antifongique, les 80% restants ayant des propriétés assez diverses: antibactériennes, antibactériennes et antifongiques à la fois, antivirales, antitumorales, insecticides, antihelminthes, etc. (Buckingham, 1997) (figure 1).

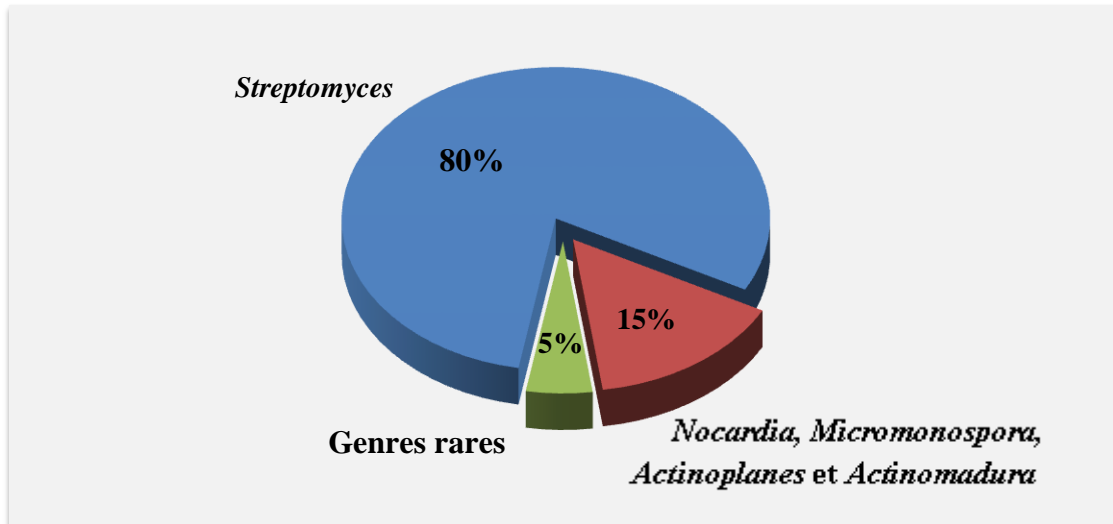


Figure 1: Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes (Okami et Hotta, 1988).

3.2.- Importance dans le domaine agronomique

Les actinomycètes ont un rôle important dans les processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Goodfellow *et al.*, 1984). Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, etc. (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Ils sont aussi capables de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (Holzapfel *et al.*, 2002). Leur grand pouvoir antagoniste leur confère également un rôle dans la distribution écologique des microorganismes (Dommergues et Mangenot, 1970) et dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes telluriques (Goodfellow et Williams, 1983; Moustiri, 1992; Merrouche, 2001). Les antibiotiques qu'ils produisent sont parfois utilisés dans la lutte chimique contre les maladies des plantes d'origine microbienne, comme c'est le cas pour la kasugamycine, la blasticidine et les polyoxines. Ces dernières sont utilisées à grande échelle depuis longtemps au Japon contre certaines maladies du riz (Misato, 1982). Le genre *Frankia* est très connu en foresterie pour son rôle dans la fixation d'azote atmosphérique en symbiose dans les nodules racinaires de certaines arbres dicotylédones (autres que les légumineuses), comme le casuarina, l'orme, l'aulne, etc. (Becking, 1974; Lechevalier, 1981). Ces plantes arbustives sont utilisées pour le reboisement des sols pauvres en matière organique.

3.3.- Divers autres rôles

La grande diversité métabolique des actinomycètes leur confère certaines propriétés inhabituelles. Par exemple, la géosmine qui donne à la terre une odeur de moisi (terreux) et à l'eau des réservoirs un goût et une odeur désagréable, est produite par certaines espèces d'actinomycètes.

4.- Taxonomie des actinomycètes

Les Actinomycétales sont classés dans 36 Familles et près de 120 genres; quelques Sous-Ordres ont pu également être définis (Tableau 2).

4.1.- Critères actuels d'identification

La systématique des actinomycètes est basée actuellement sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires.

4.1.1.- Critères morphologiques

Les critères morphologiques font appel aux caractéristiques culturales sur différents milieux de culture et aux caractéristiques micromorphologiques.

4.1.1.1.- Caractéristiques culturales

Il s'agit alors de noter :

- la présence ou l'absence de mycélium aérien (MA).
- la couleur du MA et du mycélium du substrat (MS).
- la production et la couleur des pigments diffusibles.
- la production ou non de pigments mélanoïdes. Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.

4.1.1.2.- Caractéristiques micromorphologiques

La micromorphologie de quelques genres principaux est schématisée dans la figure 2. Elle est déterminée par observation directe au microscope optique (objectifs 10 et 40) des cultures poussant sur les milieux gélosés. Certains détails nécessitent l'observation entre lame et lamelle en utilisant l'objectif 100 du microscope optique ou parfois l'utilisation du microscope électronique à balayage ou à transmission (Tresner et *al.*, 1961). Les observations portent sur le MA et le MS.

◆ Mycélium aérien (MA)

- MA stérile, fragmenté ou sporulant.
- spores mobiles ou non, isolées ou regroupées par 2, par 4 ou en chaînes plus ou moins longues.

Chapitre I - Revue Bibliographique

Les spores peuvent être sessiles ou portées par des sporophores courts ou longs ou encore

Tableau 2. Les taxa de l'ordre des Actinomycetales (Euzéby, 2013).

Sous-Ordres	Familles	Genres
<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobaculum, Actinomyces, Arcanobacterium, Mobiluncus.</i>
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium, Luteococcus, Microlunatus, Propioniferax.</i>
ND	<i>Nocardioidaceae</i>	<i>Nocardioides, Aeromicrobium.</i>
<i>Micrococcineae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus, Arthrobacter, Kocuria, Nesterenkonia, Renibacterium, Rothia, Stomatococcus.</i>
ND	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas, Cellulosimicrobium, Oerskovia.</i>
ND	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Promicromonospora.</i>
ND	<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Dermatophilus, Kineosphaera.</i>
ND	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium.</i>
ND	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Dermabacter, Brachybacterium.</i>
ND	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Intrasporangium, Janibacter, Knoellia, Terrabacter, Terracoccus, Tetrasphaera.</i>
ND	<i>Jonesiaceae</i>	<i>Jonesia.</i>
ND	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium, Agreia, Agrococcus, Agromyces, Aureobacterium, Clavibacter, Curtobacterium, Frigoribacterium, Leifsonia, Mycetocola, Okibacterium, Plantibacter, Rathayibacter, Subtercola.</i>
ND	<i>Bogoriellaceae</i>	<i>Bogoriella.</i>
ND	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Dermacoccus, Demetria, Kytococcus.</i>
ND	<i>Rarobacteraceae</i>	<i>Rarobacter.</i>
ND	<i>Sanguibacteraceae</i>	<i>Sanguibacter.</i>
ND	Famille non définie	<i>Beutenbergia, Ornithinicoccus, Ornithinimicrobium, Salana.</i>
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium, Turicella.</i>
ND	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium.</i>
ND	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia, Rhodococcus.</i>
ND	<i>Gordoniaceae</i>	<i>Gordonia.</i>
ND	<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>Tsukamurella.</i>
ND	<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia.</i>
ND	<i>Williamsiaceae</i>	<i>Williamsia.</i>
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Pseudonocardia, Actinopolyspora, Amycolatopsis, Kibdelosporangium, Prauserella, Saccharomonospora, Saccharopolyspora, Thermocrispum.</i>
ND	<i>Actinosynnemataceae</i>	<i>Actinosynnema, Actinokineospora, Crossiella, Kutzneria, Lechevalieria, Lentzea, Saccharothrix, Streptoalloteichus.</i>
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces.</i>
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Streptosporangium, Acrocarpospora, Herbidospora, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea, Planobispora, Planomonospora, Planopolyspora, Planotetraspora.</i>
ND	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis, Streptimonospora.</i>
ND	<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Thermomonospora, Actinomadura, Spirillospora, Actinocorallia</i>
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora, Actinoplanes, Asanoa, Catellatospora, Catenuloplanes, Couchioplanes, Dactylosporangium, Pilimelia, Virgosporangium.</i>
<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae</i>	<i>Frankia.</i>
ND	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus, Blastococcus, Modestobacter.</i>
ND	<i>Microsphaeraceae</i>	<i>Microsphaera.</i>
ND	<i>Sporichthyaceae</i>	<i>Sporichthya.</i>
ND	<i>Acidothermaceae</i>	<i>Acidothermus.</i>
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Glycomyces.</i>

ND, Sous-Ordre non encore défini.

formées anarchiquement sur le MA. Les chaînes de spores peuvent être droites à flexueuses (type RF = Rectus Flexibilis), en crochets ou en boucles fermées (type RA = Retinaculum Apertum) ou encore spiralées (type S = Spira). La surface des spores (observée au microscope électronique) peut être lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue.

- présence ou non de structures particulières comme les sporanges, les sclérotites les synnemata ou les endospores.

◆ Mycélium du substrat (MS)

- MS stérile ou non, fragmenté ou persistant.

- production ou non de spores (mobiles ou non) ou de sporanges.

4.2.- Chimiotaxonomie

Selon Goodfellow & Minnikin, 1985, la chimiotaxonomie consiste en l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Ces caractères ont été surtout étudiés au niveau des parois cellulaires. En effet, les caractères morphologiques adoptés par la classification classique dépendent de la nature des composés chimiques des microorganismes (O'Donnell, 1988). Les composés majeurs adoptés par cette classification sont les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires (Lechevalier et Lechevalier, 1980).

4.2.1.- Les acides aminés

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

4.2.2.- Les sucres

Les sucres diagnostiques sont principalement les couples arabinose-galactose, arabinose-xylose, rhamnose-galactose, ainsi que le madurose ou 3-O-méthyl galactose (Lechevalier et Gerber, 1970; Lechevalier et Lechevalier, 1970b; Labeda et *al.*, 1989). Sur la base de la composition des cellules en acides aminés et en sucres, plusieurs chimiotypes ont ainsi été définis (Tableau 3).

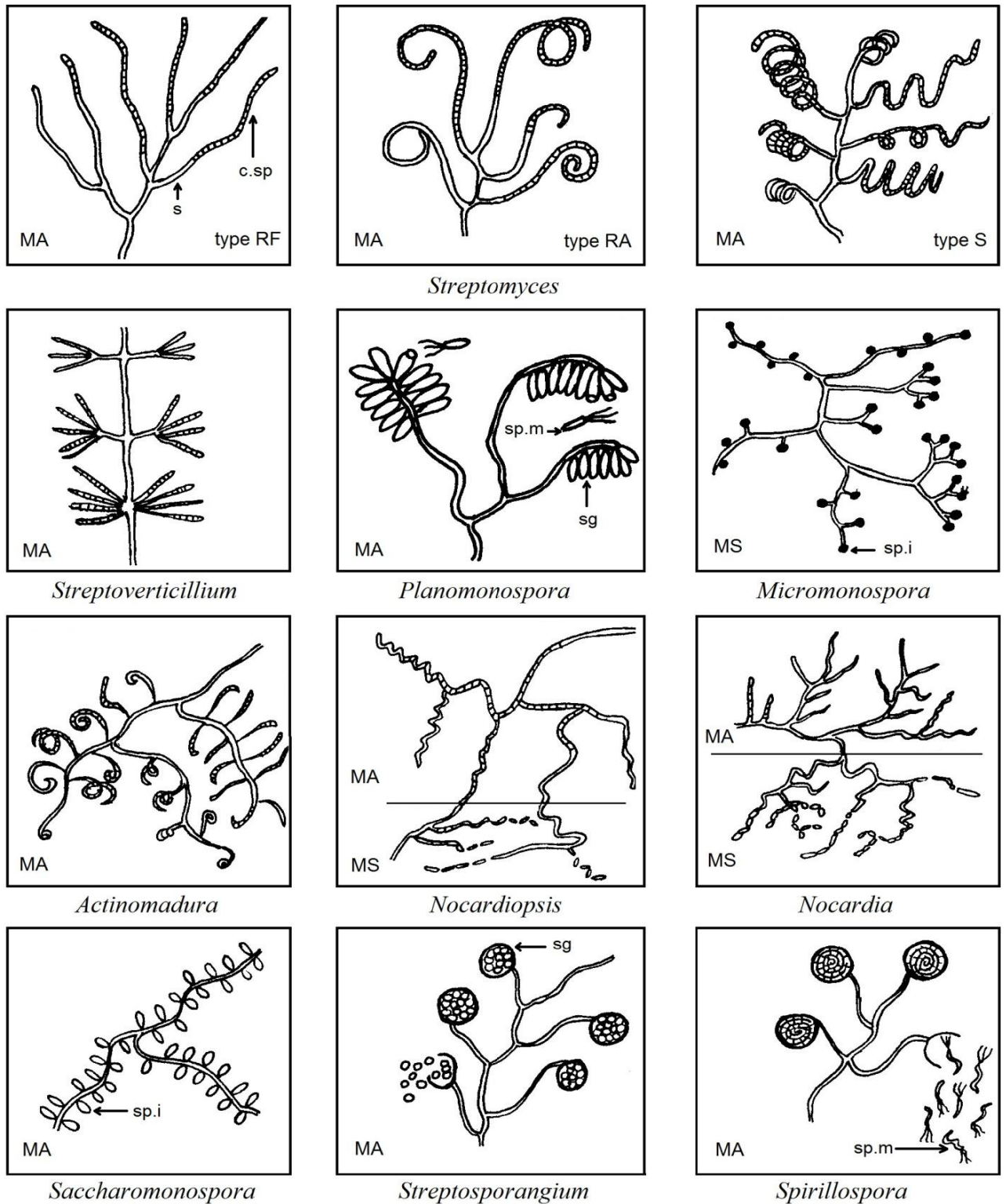


Figure 2 : Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (In Sabaou, 1988).

MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles); S, *Spira* (chaînes spiralées); s, sporophore; c.sp., chaînes de spores; sp.i., spores isolées; sp.m., spores mobiles; sg, sporanges.

Tableau 3. Principaux chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.

Chimiotype	Acide diaminopimélique		Glycine	Sucres			
	Forme LL	Forme DL		Arabinose + galactose	Arabinose + xylose	Rhamnose + Galactose	Madurose
I C	+	-	+	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	+	-	-
III B	-	+	-	-	-	-	+
III C	-	+	-	-	-	-	-
III E	-	+	-	-	-	+	-
IV A	-	+	-	+	-	-	-

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

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

4.2.3.- Les lipides

La composition des actinomycètes en lipides membranaires (phospholipides, ménaquinones, acides gras) ou pariétaux (acides mycoliques) est également un critère de détermination de chimiotypes.

4.2.3.1.- Les phospholipides

La diversité des phospholipides a permis à Lechevalier *et al.* (1977) de distinguer cinq chimiotypes notés de PI à PV et caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques (Tableau 4).

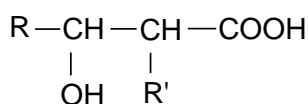
Tableau 4: Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes.

Types de phospholipides	Phosphatidyl éthanolamine	Phosphatidyl choline	Phospholipides avec glucosamine	Phosphatidyl glycérol
PI	-	-	-	V
PII	+	-	-	-
PIII	-	+	-	V
PIV	+	-	+	-
PV	-	-	+	+

Note : tous les actinomycètes possèdent le phosphatidyl inositol.

4.2.3.2.- Les acides mycoliques

Ce sont des composés pariétaux présents uniquement chez les actinomycètes ayant le chimiotype IVA. Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence (Mordarska *et al.*, 1972). Leur structure générale est la suivante:

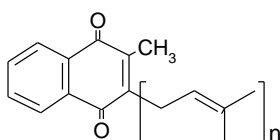


4.2.3.3.- Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des composés lipidiques membranaires constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique contenant des unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collins et *al.*, 1980).

Ex. : ménaquinone MK10 (H₂) présent chez *Nocardiosis*: ménaquinone avec dix unités isoprènes dont deux sont hydrogénées.

Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus avec les phospholipides. Leur structure générale est la suivante:



Entre crochets = unité isoprène.

4.2.3.4.- Les acides gras

La composition en acides gras des membranes plasmiques a également contribué dans la séparation entre certains genres (Minnikin et *al.*, 1975) et est ainsi utilisée en combinaison avec les autres critères chimiques. Leurs types et leurs pourcentages sont caractéristiques de plusieurs genres (Grund et Kroppenstedt, 1990; Kroppenstedt et *al.*, 1992; Rainey et *al.*, 1996).

4.3.- Critères physiologiques et taxonomie numérique

4.3.1.- Tests physiologiques

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents), ainsi que la tolérance au pH, à la température, à la salinité, etc.

Les tests physiologiques sont utilisés à l'échelle générique pour la détermination des espèces d'actinomycètes (Atika, 2012).

4.3.2.- Taxonomie numérique

La taxonomie numérique a apporté énormément de clarté dans la reconnaissance, auparavant très confuse, des espèces et a mis en évidence les caractères discriminants (Kroppenstedt, 1990; etc.). Elle a même permis la création de genres, tel que *Rhodococcus* (Goodfellow et Alderson, 1977).

4.4.- Critères moléculaires

La biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant et incontournable en taxonomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer la création d'une nouvelle espèce sans passer par les analyses génétiques. Ces études génétiques ont permis de tracer toute 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; Pochner *et al.*, 1985; Miyadoh *et al.*, 1990; Ochi *et al.*, 1993) ou de fusionner des genres entre eux (Stackebrandt et Kroppenstedt, 1987).

Les principales analyses moléculaires utilisées en taxonomie des actinomycètes pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et l'hybridation ADN-ADN. Le pourcentage de G + C n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de création de nouveaux genres.

4.4.1.- Etude de l'ARN ribosomique (ARNr)

Les techniques de base utilisées dans cette étude sont la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage. Stackebrandt *et al.* (1981 et 1983) sont les premiers à utiliser ces techniques pour la taxonomie des actinomycètes. Dans ce cas, la partie de l'ADN génomique (ADNr), codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) en particulier 16S (d'une taille de l'ordre de 1600 paires de bases) est amplifiée par PCR, puis les séquences du produit sont alors déterminées. Les séquences obtenues des différents taxons sont soumis à des études de comparaisons (ou encore de phylogénie) entre elles ou bien avec des espèces de références répertoriées dans des banques de données génomiques. Pour effectuer ces genres d'études, plusieurs méthodes de calculs ont été mises au point et sont disponibles sous forme de programmes informatisés gratuits sur le Web (Philip, Clustal W, etc.).

L'analyse de l'ARNr 16S constitue un outil très rapide pour l'identification des espèces. Ces dernières années, elle a été utilisée pour les groupes à un niveau supra-générique (Famille, Ordre et même Classe) (Labeda et Kroppenstedt, 2000; Richert *et al.*, 2005).

4.4.2.- Hybridation ADN-ADN

Tout comme l'analyse de l'ARNr, la réassociation ADN-ADN est utilisée de façon certaine pour l'identification des espèces en comparaison avec celles déjà décrites. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance (taux de réassociation de leurs brins d'ADN) inférieur à 70 % (Wayne *et al.*, 1987).

4.4.3.- Pourcentage de guanine - cytosine (G + C)

Parmi les caractères importants non seulement dans la reconnaissance des genres mais aussi des familles d'actinomycètes (qui commencent actuellement à être bien définis), nous noterons la détermination du coefficient de Chargaff (G + C %) qui a permis de reconsidérer la définition des actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G + C supérieur à 55 %. Ceci a permis de différencier la lignée des actinomycètes de celle des Bacillaceae, des Lactobacillaceae et d'autres bactéries à Gram + (G + C inférieur à 55 %). De même, d'autres 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).

4.5.- Le genre *Streptomyces*

C'est le plus grand genre du monde bactérien, avec environ 630 espèces décrites (Euzéby, 2013). Il appartient à la famille des *Streptomycetaceae* et au sous-ordre des *Streptomycineae*. Morphologiquement, il possède un mycélium du substrat abondamment ramifié, généralement non sporulé, surmonté par un mycélium aérien produisant des sporophores qui donnent naissance à des chaînes de spores (jusqu'à 50 ou plus) de formes variées: droites (*Rectus Flexibilis*), incurvées ou en boucles (*Retinaculum Apertum*) ou spiralées (*Spira*). Les spores (ou conidies) ne sont pas mobiles et ont une surface lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue. *Streptomyces* possède le chimiotype I C, des phospholipides de type PII et un taux de GC compris entre 68% et 78% (Bergey, 2004). Selon Stackebrandt et al. (1997), les membres de la famille des *Streptomycetaceae* doivent avoir comme caractéristiques les séquences de nucléotides « signatures » suivantes: 71 (G), 543 (A-U), 603-635 (C-G), 610 (A), 747 (A), 952-1229 (U-A), 80-89 (G-C), 81-88 (C-G), 82-87 (U-G), 127-234 (G-C), 209 (C), 210 (C), 211 (G), 610 (G), 671-735 (U-A), 819 (G), 837-849 (C-G), 950-1231 (U-G), 955-1225 (C-G), 965 (C), 1254-1283 (A-U) et 1409-1491 (C-G).

II. LES ANTIBIOTIQUES

1.- Généralités sur les antibiotiques

Depuis la découverte de l'effet antagoniste chez les microorganismes et la caractérisation du premier antibiotique par Gosio en 1896, des milliers d'autres molécules actives ont été décrites. En plus des microorganismes (en particulier les actinomycètes qui produisent la majorité de ces molécules), les antibiotiques ont été isolés également à partir des plantes et des animaux. Ils peuvent aussi être produits par voie de d'hémisynthèse ou de synthèse (Breton *et al.*, 1989; Sanglier, 1990).

2.- Classification

Les antibiotiques constituent un groupe de molécules bioactives très variées qui peuvent être classées selon plusieurs critères: la nature chimique, l'origine, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Les molécules présentant des caractères voisins ou identiques sont groupées dans des familles, sous-familles et groupes (Berdy, 2005; Bycroft, 1988). La chronologie de découvertes des différentes classes d'antibiotiques et leur introduction dans les pratiques médicales sont illustrées dans la figure 3. La classification la plus utilisée en recherche fondamentale est celle de Berdy *et al.* (1987) qui repose sur la nature chimique des antibiotiques (Tableau 5).

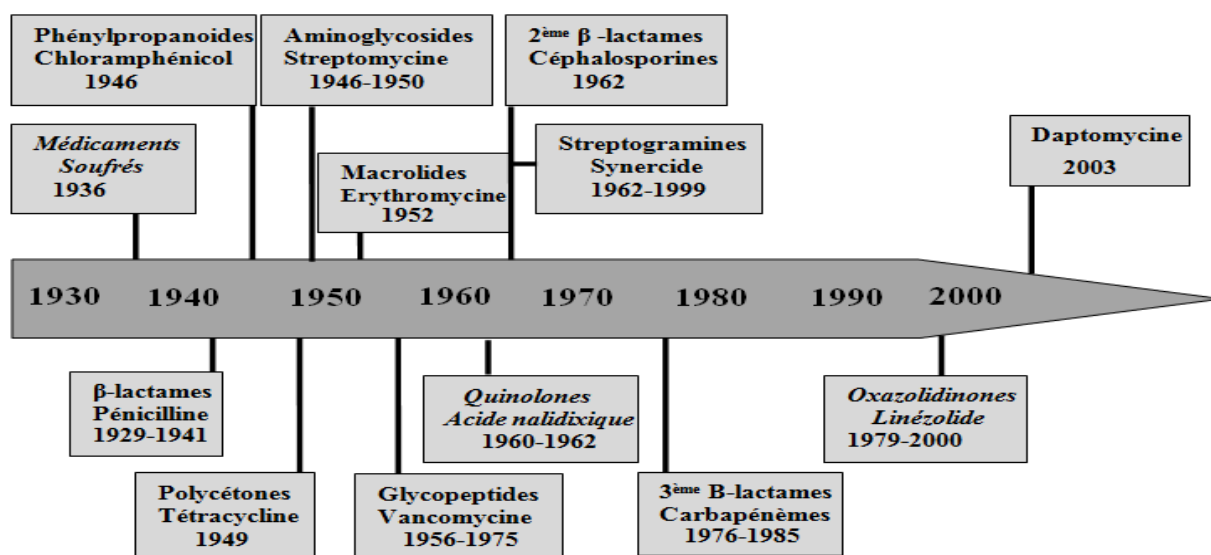


Figure 3 : Chronologie de la découverte des différentes classes d'antibiotiques et leur introduction en clinique (Singh et Barrett, 2006).

Les produits listés en police normale sont des produits naturels ou semi-synthétiques, et ceux en italique sont des produits de synthèse.

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	- érythromycine, spiramycine - nystatine, amphotéricine - maytansine
Quinones et antibiotiques apparentés	- composés polycycliques linéairement condensés - anthraquinones - naphthoquinones - benzoquinones	- tétracyclines - anthracyclines - rubomycine - mitomycine, saframycine
Acides aminés et peptides	- dérivés d'acides aminés - homopeptides - peptides - lipopeptides	- pénicilline, cyclosérine - bacitracine - valinomycine - polymyxines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	- hétérocycles non condensés - hétérocycles condensés	- mildiomycine - phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	- dérivés du furanne - polyéthers	- monensine
Antibiotiques aromatiques	- composés benzéniques - composés aromatiques condensés - autres dérivés	- chloramphénicol - griséofulvine - novobiocine
Antibiotiques alicycliques	- dérivés du cyclo-alcane - terpènes - oligoterpènes	- cycloheximide - acide marasmique - acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	- dérivés d'alcanes - dérivés des acides carboxyliques aliphatiques - composés contenant du phosphore	- élaiomycine - cérulénine - fosfomycine

3.- Mode d'action des antibiotiques

Le mode d'action d'un antibiotique est en relation avec sa structure chimique. En général, à chaque classe d'antibiotique est associé un site d'action dans la cellule microbienne. Ce site peut être la paroi cellulaire, la membrane plasmique, les ribosomes ou les composants génétiques (figure 4). Cette activité se manifeste sous forme d'inhibition enzymatique de type compétitif par

analogie structurale (ex.: cyclosérine), de fixation sur les sous-unités ribosomiques (ex.: macrolides), d'inhibition de la formation des liaisons peptidiques au niveau des ribosomes (ex.: chloramphénicol), de complexation avec des enzymes (ex.: sulfamides), etc.

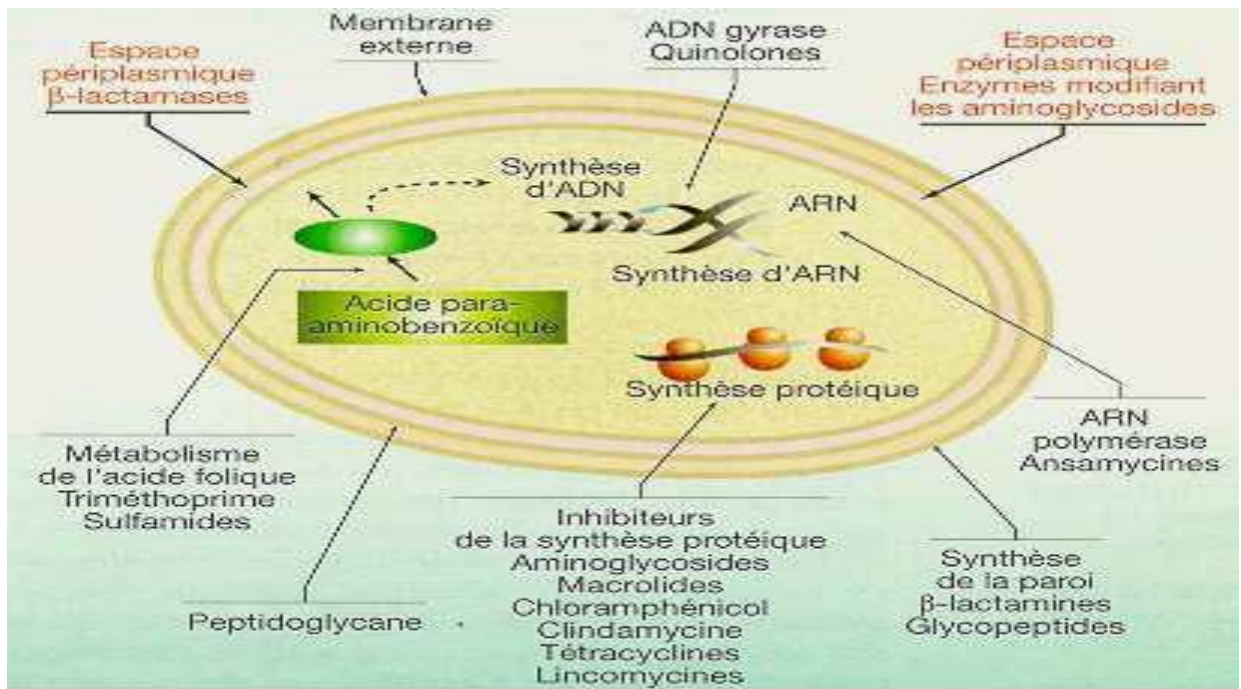


Figure 4 : Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (Davies et Mazel, 1997).

4.- Biosynthèse, purification et détermination des structures des antibiotiques

4.1.- Biosynthèse

En dépit de leur grande diversité chimique, les antibiotiques naturels dérivent biochimiquement d'un nombre restreint de précurseurs fournis par le métabolisme primaire microbien, tels que les acides gras, les acides aminés et les bases puriques et pyrimidiques. Cette variété structurale résulte non pas du nombre de voies de biosynthèses de départ (assez réduit), mais plutôt des chaînes de réactions enzymatiques terminales variées: condensation, polymérisation, méthylation, oxydation et réduction (Vinig, 1985; Martin et Liras, 1989; O'hagan, 1991). Ainsi, les antibiotiques synthétisés sont en général caractérisés par des structures chimiques principales marquant souvent la voie de biosynthèse dont elles dérivent. (polykétides, aminosides, etc.). Ces noyaux principaux sont utilisés pour classer les antibiotiques dans plusieurs grandes familles. Par contre, les groupements chimiques latéraux marquent souvent les différences entre les antibiotiques et de ce fait sont utilisés pour distinguer les sous-groupes et les différents antibiotiques entre eux.

A l'échelle génétique, chez les actinomycètes, les gènes responsables de la biosynthèse, de la régulation et de la résistance aux antibiotiques, sont organisés dans une même région sous forme

de "cluster" de 15 à 100 kb ou même plus. Ce matériel génétique est souvent porté par l'ADN génomique mais parfois aussi par des plasmides (ex.: la méthylénomycine produite par *Streptomyces coelicolor*). Cette organisation modulée a beaucoup facilité la manipulation des gènes et leurs transferts chez d'autres espèces (clonage, formation d'hybrides) pour l'amélioration des productions. Le cas de la pénicilline est le plus connu: la production a pu être continuellement améliorée et dépasse actuellement les 40 g/l alors que les souches originales ne produisaient que des traces d'antibiotiques (1 à 20 mg/l) (Larpent et Sanglier, 1989). L'utilisation de précurseurs marqués et des mutants bloqués à différents stades de la biosynthèse des antibiotiques a été d'un apport considérable dans la compréhension des voies de biosynthèses de ces métabolites.

A l'échelle des fermentations, la production des antibiotiques débute vers la fin de la phase de croissance et se poursuit pendant la phase stationnaire. Certains travaux ont même montré que cette production peut débiter durant la phase exponentielle de croissance (Lebrihi *et al.*, 1987; Lamari *et al.*, 2002a, etc.).

Les cinétiques de fermentation ont montré que plusieurs facteurs interviennent sur la croissance et la production d'antibiotiques et peuvent agir positivement ou négativement sur celles-ci. Pour cela, des milieux offrant un bon compromis sont toujours développés pour répondre aux besoins optimaux des fermentations qui peuvent être d'ordre nutritionnel ou environnementaux.

- les constituants du milieu de culture : choix et proportion des sources de carbone, d'azote de phosphate inorganique, de sels minéraux, d'oligoéléments, de précurseurs, de vitamines et d'autres facteurs.

- les conditions de cultures: choix du pH, de la température, du taux d'oxygénation et du type et de la vitesse d'agitation.

Parmi les effets assez marqués que peuvent avoir les substances sur la production d'antibiotiques, il y a lieu de signaler l'effet répressif du glucose, des phosphates et des ions ammonium. Cet effet est sous la dépendance de la concentration utilisée, du moment de son introduction dans la fermentation et de l'antibiotique produit (Larpent et Sanglier, 1989). Il y a lieu aussi de signaler l'effet positif de certains éléments comme le CaCO₃ qui joue le rôle de tampon empêchant les écarts importants et défavorables qui peuvent surgir sur la valeur du pH et en favorisant ainsi la production de biomasse et d'antibiotiques. Plusieurs travaux ont rapporté l'utilisation bénéfique du CaCO₃ en fermentation pour les actinomycètes, entre autre les genres *Saccharothrix* (Isshiki *et al.*, 1989; Igarashi *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 2000; etc.).

4.2.- Purification

L'étude des substances naturelles, en particulier s'il s'agit de molécules inconnues, nécessite toujours leur isolement de la matrice brute où elles sont synthétisées. Pour cela, plusieurs étapes d'extractions et de purifications sont indispensables. Pour purifier les antibiotiques, de nombreuses techniques ont été décrites en littérature. Elles varient selon les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées. Certains protocoles établis ont même été conseillés pour tel ou tel groupe d'antibiotiques. Mais en général, les étapes de purification restent assez longues et difficiles à réaliser, en particulier dans les cas où les antibiotiques étudiés sont de nature inconnue et très contaminés par de nombreuses substances indésirables présentes dans les milieux de fermentations et possédant les mêmes propriétés physico-chimiques. Parmi toutes les techniques décrites, celles se rapportant à la chromatographie liquide restent les plus utilisées et permettent une purification totale des antibiotiques (Zitouni, 2005).

Mais avant de soumettre les antibiotiques à la purification, une première extraction liquide-liquide est souvent réalisée et permet une première séparation des produits actifs du filtrat de culture.

Cette étape est effectuée toujours par des solvants organiques de polarités différentes. Par la suite les produits bruts obtenus sont traités en chromatographie liquide. Deux types de chromatographie sont possibles.

- sur plaque: sur papier (CP) ou sur couche mince (CCM).
- sur colonne: à pression atmosphérique ou basse pression ou encore à haute pression (HPLC).

La purification totale, même de produits isomères, est rendue possible grâce à l'amélioration des performances de la chromatographie liquide en haute pression (HPLC).

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

- chromatographie d'adsorption: la phase stationnaire est un adsorbant et la séparation est basée sur des étapes d'adsorption et de désorption successives.
- chromatographie de partage (liquide-liquide): la séparation est basée sur le partage des constituants de l'échantillon entre deux phases liquides.

En effet, ces deux types de séparation coexistent souvent dans les systèmes chromatographiques.

Dans ces types de systèmes chromatographiques, on peut par contre différencier deux types très connus, selon la polarité relative des deux phases, stationnaire et mobile: la chromatographie à phase normale et la chromatographie à phase inversée. Cette dernière a connu les plus grandes applications pour la purification des antibiotiques.

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

- chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel): la phase stationnaire présente des pores de dimensions déterminées. Les composants de l'échantillon sont séparés suivant leurs dimensions. Actuellement des résines de synthèse (ex.: gel de séphadex) résistantes aux solvants organiques sont également utilisées. Ces résines rendent possible l'utilisation de gradient dans la phase mobile.

Un exemple de protocole général de purification souvent rencontré dans le cas des antibiotiques est illustré par la figure 5.

Les techniques de séparation sont souvent accompagnées de tests de révélations chimiques (chromogéniques), spectroscopiques (UV-visible, infrarouge) ou microbiologiques (bioautographie et antibiographie) pour la détection des antibiotiques ainsi que pour avoir des informations sur leur nature, ce qui peut orienter la purification.

4.3.- Détermination des structures chimiques des antibiotiques

La caractérisation des structures chimiques des antibiotiques est le résultat de combinaison de plusieurs données obtenues par différentes analyses, principalement spectroscopiques, mais aussi chimiques, physico-chimiques et chromatographiques (Zitouni, 2005).

Les méthodes chromatographiques (CP ou CCM, avec différents systèmes d'élution) combinées à des réactions chimiques chromogéniques, ont été souvent utilisées pour une première estimation du nombre de molécules actives ainsi que pour obtenir des informations sur leur nature chimique. Dans certains travaux, les données chromatographiques des antibiotiques les plus connus, ont été répertoriées (Wagman et Weinstein, 1980) pour servir de référence afin de rechercher la nature des antibiotiques présents dans les préparations brutes.

Les méthodes spectroscopiques (comme l'absorption en UV-visible et en infrarouge), parfois combinées avec des réactions chimiques, sont utilisées pour rechercher la présence de certains groupements chimiques caractéristiques dans les molécules d'antibiotiques (comme les chromophores, les liaisons conjuguées, certains groupements fonctionnels, etc.), ou encore pour détecter la présence de certains types d'antibiotiques comme les polyènes qui possèdent des spectres d'absorptions caractéristiques en UV-visible (Chan et Aszalos, 1987). Les spectres d'absorption en UV-visible et en IR sont également comparés à ceux des antibiotiques déjà répertoriés pour faire des rapprochements vers tel ou tel type de structure ou groupes d'antibiotiques.

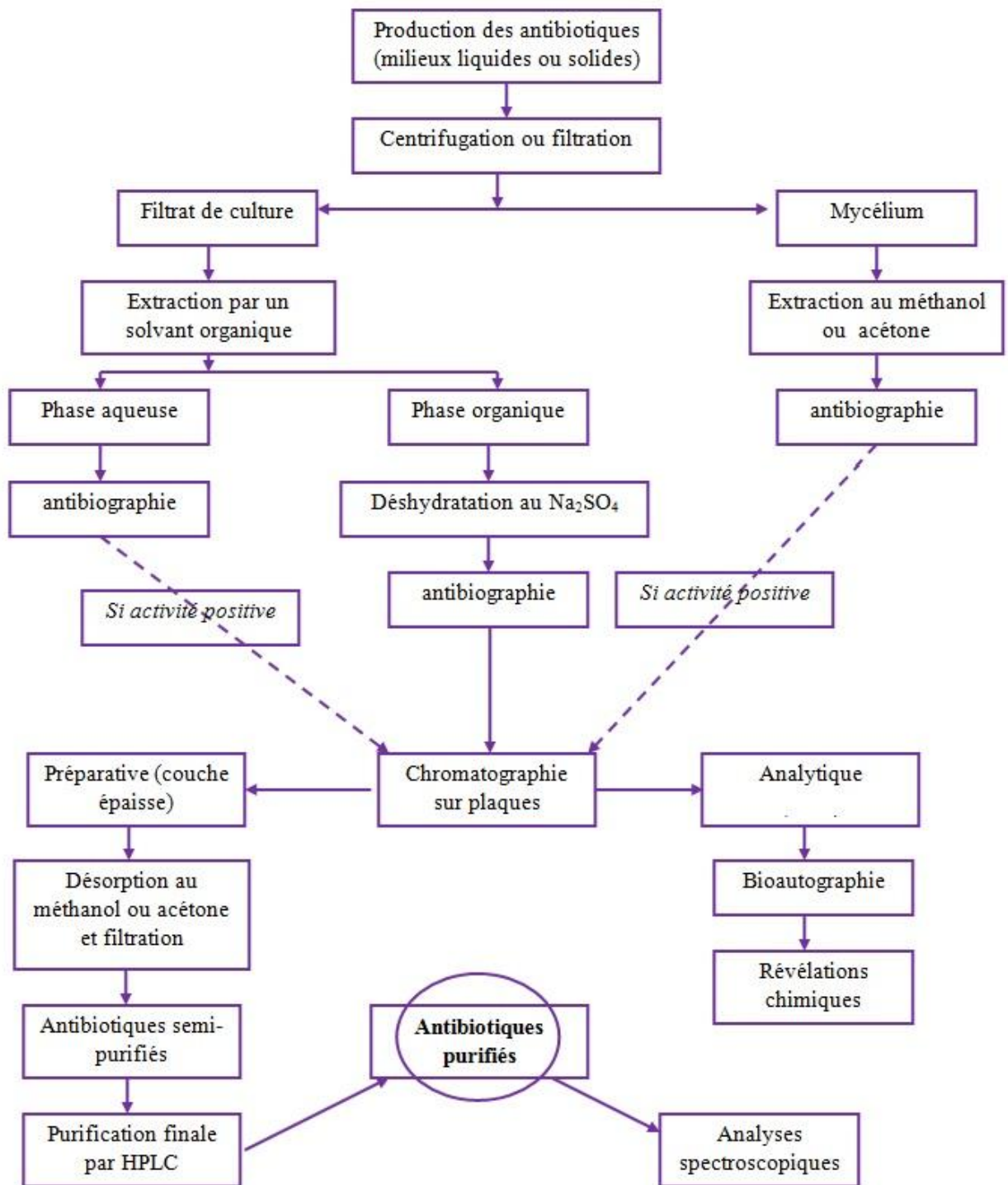


Figure 5 : Exemple de protocole général de purification des antibiotiques (Zitouni, 2005).

L'introduction des techniques modernes d'analyses spectroscopiques de haute technologie et de haute performance dans la caractérisation structurale a été d'un grand apport pour l'identification finale des antibiotiques. Parmi ces méthodes nous citons:

La spectrométrie de masse, par ses différentes techniques, permet d'avoir les masses moléculaires et même les formules chimiques des antibiotiques avec une grande certitude (Masse

à haute résolution). Les profils de masse obtenus par fragmentation progressive des molécules d'antibiotiques permettent parfois de déduire la présence de certaines structures chimiques et de faire des comparaisons avec des profils de molécules répertoriées. La technique de "nanospray" a également permis la détection et l'analyse d'antibiotiques même à l'état de traces. Le couplage LC-MS (liquide chromatography-mass spectrometry) permet aujourd'hui la détermination des masses moléculaires de tous les composants d'un profil chromatographique (Nelson and Cox, 2004).

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

La RMN (résonance magnétique nucléaire) du proton et celle du carbone 13 sont des outils très performants et déterminants dans la caractérisation des structures chimiques. A l'heure actuelle, tous les travaux de caractérisation des antibiotiques en font usage. Les diverses analyses de RMN permettent de localiser les différents atomes des molécules, de déduire leur nombre et d'établir des valeurs de corrélation entre ces atomes ainsi que la position tridimensionnelle de chacun d'eux. Les données obtenues sont interprétées et permettent ainsi d'avoir la structure définitive des molécules (Nelson and Cox, 2004).

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

I.- ORIGINE DES SOLS ET MATERIEL BIOLOGIQUE

1.- Echantillons de sols

L'isolement des souches d'actinomycètes est réalisé à partir de 14 échantillons de sols provenant de trois régions sahariennes différentes; Ain amenas (latitude, 28°02'N; longitude, 09°56'E; altitude, 587 m) Boussaâda (latitude: 35°20'N; longitude: 04°12'E; altitude: 461 m) et Djelfa (latitude: 34°41'N; longitude: 03°15'E; altitude: 1144 m).

Les prélèvements ont été effectués aseptiquement, loin de toute influence racinaire et en surface (vingt premiers centimètres).

2.- Les souches de microorganismes-cibles

Les microorganismes-cibles ont été utilisés pour déterminer les activités antagonistes et le spectre d'action des actinomycètes, Les milieux utilisés pour la purification des germes-cibles sont le milieu PDA pour les champignons et le milieu ISP2 pour les bactéries et les levures (voir annexe 1).

II.- ISOLEMENT DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES

1.- Milieu d'isolement

Les souches d'actinomycètes sont isolées sur le milieu chitine-vitamine B (Ch-VB) (voir annexe 1), qui a fournit de bons résultats du point de vue de leur sélection et de la mise en évidence d'une grande diversité d'espèces (Hayakawa et Nonomura, 1984; Boudjella, 1994).

2.- Agents sélectifs

L'ajout d'agents sélectifs au milieu Ch-VB permet de sélectionner divers genres, espèces et souches particulières (Boudjella, 1994). Le choix des agents et des concentrations utilisés est basé sur les bons résultats obtenus par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba. Pour cela nous avons additionné au milieu Ch-VB cinq antibiotiques antibactériens pris un à un, à des concentrations précises: la rifampicine et la streptomycine (10 mg/L pour chacun), le chloramphénicol, la kanamycine et la pénicilline (25 mg/L pour chacun). Le milieu Ch-VB est également additionné d'actidione à raison de 80 mg/L pour empêcher la croissance des champignons indésirables présents dans les sols.

3.- Ensemencement et incubation des actinomycètes

La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions-dilutions (Rapilly, 1968) et étalement sur milieu Ch-VB coulé en boîtes de Pétri stériles. Les suspensions-mères sont préparées par agitation vigoureuse pendant 5 min de 1 g de sol dans 9 mL d'eau distillée stérile. Elles sont ensuite diluées en série jusqu'à 10^{-4} . Un volume de 0,1 mL de chaque dilution est étalé

Chapitre II - Matériel et méthodes

sur le milieu Ch-VB et deux essais sont effectués pour chaque dilution. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30 °C pendant 14 jours (Boudjella, 2007).

4.- Reconnaissance des actinomycètes

Toutes les colonies d'actinomycètes qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement sont systématiquement observées directement à l'œil nu et au microscope optique (Zeiss) aux grossissements 10 × 10 et 10 × 40. Ces observations permettent de reconnaître (de manière préliminaire) les différents genres, de sélectionner les colonies appartenant à un grand nombre de genres et d'éviter de retenir un nombre élevé d'isolats susceptibles d'appartenir à une même espèce. La diversité culturelle est ainsi soigneusement analysée et recherchée

5.- Purification et conservation

Les colonies sélectionnées sont prélevées délicatement à l'aide d'une pointe stérile puis purifiées par stries sur milieu ISP2 «International *Streptomyces* Project» (Shirling et Gottlieb, 1966), à base de glucose, d'extrait de malt et l'extrait de levure (voir annexe 1). Les isolats purifiés sont ensemencés sur le même milieu coulé en tubes inclinés. Ces derniers sont incubés à 30°C pendant 14 à 28 jours, puis conservés à 4°C. Le milieu ISP2 est choisi car il permet une croissance et une sporulation relativement bonnes de nos souches (Boudjella, 2007).

1.- Choix des souches

Lors des tests préliminaires, cinq souches d'actinomycètes ayant montré une activité antifongique intéressante, ont été sélectionnées pour les étudier taxonomiquement.

2.- Etude morphologique

2.1.- Macromorphologie

Cette étude consiste à noter, au 7ème, 14ème et 21ème jours d'incubation à 30°C, la croissance des souches, l'aspect et la couleur des mycélium aérien et du substrat et la production et la couleur des pigments diffusibles sur les milieux de culture suivants: l'ISP2, l'ISP3 et l'ISP4 préconisés lors de l'ISP (Shirling et Gottlieb, 1966), Bennett. La composition des milieux est donnée en annexe 1.

Les différentes couleurs sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color: ISCC-NBS).

3.- Analyse des constituants cellulaires

Cette étude consiste, en plus des études morphologiques, à compléter l'identification du genre. Les analyses sont effectuées sur des hydrolysats ou des extraits cellulaires afin de déterminer la forme isomérique de l'acide diaminopimélique, la présence ou non de glycine,

Chapitre II - Matériel et méthodes

l'identification des sucres et la détermination des phospholipides membranaires caractéristiques des genres (Bergey, 2004).

3.1.- Obtention de la biomasse mycélienne

Les souches sont cultivées sur milieu ISP2 liquide (50 mL par Erlenmeyer de 250 mL) en agitation permanente (à 250 rpm) et incubée à 30°C. Après 4 jours, lorsque la culture devient dense, le mycélium est recueilli par centrifugation, lavé plusieurs fois à l'eau distillée, séché à 37°C durant une nuit puis conservé au congélateur pour les analyses ultérieures.

3.2.- Analyse des acides aminés pariétaux

L'acide diaminopimélique (DAP) est un composé présent au niveau des parois cellulaires des actinomycètes; il peut être parfois accompagné par la glycine. Il s'agit dans ce cas de déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique, qui peut être sous forme LL ou DL (= méso) et de noter la présence ou l'absence de la glycine dans les parois.

La méthode utilisée est celle de Becker *et al.* (1964). Dix milligrammes de mycélium sec sont hydrolysés pendant 18 h à 100°C par 1 mL de HCl 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés. Après refroidissement, les hydrolysats sont filtrés sur membranes en verre pour éliminer les débris mycéliens. Les filtrats sont évaporés à sec dans un bain de sable chaud. Des lavages à l'eau distillée sont effectués jusqu'à l'élimination complète du HCl et l'obtention d'un pH compris entre 5,5 et 7.

Le résidu sec obtenu est repris dans 0,3 mL d'eau distillée. Quinze microlitres sont chromatographiés sur papier Wathman n° 1. Les papiers sont développés pendant 18 h par chromatographie descendante à front perdu dans un solvant composé de méthanol, eau distillée, HCl 10N et pyridine (8-17,5-2,5-10 en volumes). Dix microlitres d'une solution aqueuse à 0,01 M d'acide diaminopimélique (Fluka) qui est un mélange des isomères LL et DL, ainsi qu'une solution aqueuse de glycine à 0,2 %, sont utilisés comme standards et chromatographiés en parallèle.

La révélation des chromatogrammes se fait par une solution à 0,2% (w/v) de ninhydrine dissoute dans l'acétone, suivie d'un chauffage pendant 5 min à l'étuve à 100°C.

Les tâches de DAP sont de couleur olive-brunâtre virant par la suite au jaune vif. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL (Becker *et al.*, 1964). La glycine apparaît de couleur violette et migre plus rapidement que les deux isomères de DAP.

3.3.- Analyse des sucres cellulaires

La méthode d'analyse est celle de Lechevalier et Lechevalier (1970b). Cinquante milligrammes de mycélium sec sont hydrolysés par 2 mL de H₂SO₄ 1 N dans des tubes hermétiquement fermés, pendant 2 h à 100°C. Après refroidissement, l'acide est neutralisé avec

Chapitre II - Matériel et méthodes

une solution saturée d'hydroxyde de baryum. Le précipité blanc obtenu est éliminé par centrifugation (4000 g durant 20 min). Le surnageant est recueilli, évaporé à sec à 40°C au Rotavapor, puis dissout dans 0,3 mL d'eau distillée. Vingt microlitres d'hydrolysats sont déposés sur papier Wathman n°1, de même que 15 µL de solutions aqueuses standards à 0,1% des sucres suivants: arabinose, galactose, glucose, mannose, ribose, rhamnose et xylose.

Les papiers sont développés durant 36 h par chromatographie descendante (à front perdu) dans un système de solvant composé par la partie supérieure d'un mélange de *n*-butanol - eau distillée - pyridine - toluène (5/3/3/4 en volumes). Les chromatogrammes sont séchés à température ambiante avant d'être révélés par une solution acide de phtalate d'aniline (3,25 g d'acide phtalique dissout dans 100 mL de *n*-butanol saturé avec de l'eau distillée, plus 2 mL d'aniline). Après chauffage à 100°C pendant 5 min, les tâches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses.

3.4.- Analyse des phospholipides membranaires

La méthode utilisée est celle préconisée par Minnikin *et al.* (1977). Quatre cent mg de mycélium sec est mis dans un Erlenmeyer de 250 mL hermétiquement fermé, contenant 40 mL du mélange chloroforme - méthanol (2/1) puis laissé en agitation (140 rpm) durant une nuit à température ambiante. L'extrait organique est ensuite récupéré et évaporé à sec à 37°C au Rotavapor. Le résidu est dissout dans 0,3 mL du même mélange de solvants, puis 10 µL de cet échantillon sont déposés en double dans deux plaques de gel de silice GF254 (Fluka) et développés par chromatographie ascendante dans un système de solvants composé de "chloroforme - méthanol - eau distillée" (65/25/4). De même, 10 µL des solutions témoins de phospholipides (0,01 g dans 1 mL de chloroforme), la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont également chromatographiés en parallèle.

La première plaque est révélée avec le réactif de Dragendorff selon Munier et Macheboeuf (Merck, 1975, voir composition en annexe 2) pour la détection de la PC dont les tâches apparaissent de couleur jaune-orange vif et la seconde plaque, avec une solution de ninhydrine (0,2% dans de l'acétone) pour la détection de la PE, de couleur violette, après un chauffage de 5 min à 100°C.

4.- Etude physiologique

Une série de tests physiologiques discriminants, généralement utilisés par les taxonomistes pour la différenciation entre les espèces des actinomycètes, est retenue pour l'identification de nos souches. Ces tests sont cités ci-après et les méthodes ainsi que la composition des milieux de culture sont donnés en annexe 1.

Chapitre II - Matériel et méthodes

4.1.- Production de pigments mélanoides

La mise en évidence des pigments mélanoides est réalisée sur les milieux gélosés ISP6 et ISP7 recommandés à cet effet par Shirling et Gottlieb (1966).

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

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence de composés glucidiques en utilisant le milieu minéral de base ISP9 (Shirling et Gottlieb, 1966) (voir annexe 1). Le test est considéré comme positif lorsque la croissance est supérieure à celle du témoin sans sucres.

Les glucides et dérivés testés comme seule source de carbone sont les suivants: arabinose, fructose, galactose, glucose, inositol, mannitol, raffinose, rhamnose, et xylose, Salicine, Sucrose

4.3.- Dégradation de divers autres composés organiques

Les tests sont les suivants:

- Dégradation de l'amidon, la xanthine, le phénol et l'azide de sodium (Gordon *et al.*, 1974).
- Utilisation de la proline, l'histidine et la phénylalanine comme seule source d'azote (Holt *et al.*, 1994). Histidine

4.4.- Tests de sensibilité aux antibiotiques et au NaCl

- Résistance aux antibiotiques (mg/L): chloramphénicol (25), Rifampicine (10), kanamycine (25), pénicilline (25) et streptomycine (10).
- Sensibilité au NaCl (7 et 15% w/v).

5.- Etude moléculaire

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

5.1.- Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est obtenu à partir d'une culture agitée de la souche d'actinomycète dans 100 mL de milieu ISP2 à 30°C pendant 4 jours. La culture est centrifugée puis le mycélium est lavé deux fois à l'eau bidistillée. La méthode d'extraction de l'ADN est celle de Liu *et al.* (2000). Elle consiste à:

- 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 dodécyl: 1%.
- ajouter, en dispersant, une petite quantité de mycélium à l'aide d'une spatule stérile et laisser pendant 10 min à température ambiante.

Chapitre II - Matériel et méthodes

- 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 rpm 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 rpm pendant 2 min et éliminer le surnageant.
- laver l'ADN avec 300 μL d'éthanol à 70%, centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 min, éliminer le surnageant et sécher le culot (l'ADN) à l'air et suspendre de nouveau le culot dans 50 μL d'eau bidistillée stérile.

5.2. 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) et 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines). Le rapport $\text{DO}_{260\text{ nm}}/\text{DO}_{280\text{ nm}}$ doit être compris entre 1,8 et 2. S'il est $\leq 1,8$, il y a contamination par des protéines. S'il est $\geq 2,0$ il y a contamination par des ARN. Le calcul de la quantité d'ADN nous est donné par la formule suivante:

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution} (\mu\text{g} / \text{mL}). \quad (1 \text{ unité } \text{DO}_{260\text{ nm}} = 50 \mu\text{g/mL d'ADN}).$$

5.3. Electrophorèse sur 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 laissé refroidir sans se solidifier pour pouvoir ajouter 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de BET (Sigma). Avant de couler le gel, un peigne est placé dans la cuve à électrophorèse. Il ne sera enlevé qu'après solidification du gel et servira à former des puits dans lesquels seront déposés les échantillons. Le gel horizontal est recouvert de tampon de migration TAE 1X. Chaque échantillon d'ADN sera déposé dans un des puits du gel immergé dans le tampon. Pour que l'échantillon tombe au fond du puits, il sera alourdi avec un tampon de charge contenant 0,25% de bleu de bromophénol (Fisher Scientific Labosi), servant de marqueur de mobilité et 40% (w/v) de saccharose (Fisher Scientific Labosi) dissout dans de l'eau. Pour estimer la taille de nos échantillons après électrophorèse, un marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (Promega), préparé selon les recommandations du fournisseur (1 volume de blue/orange 6X Loading Dye pour 5 volumes de solution DNA Ladder) est déposé dans un puits de manière à le faire migrer de la

Chapitre II - Matériel et méthodes

même manière que nos échantillons. Ce marqueur de taille contient différents fragments d'ADN de tailles connues qui serviront de référence pour estimer la taille de nos échantillons. La migration se fait en 30 min à 50 V.

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

5.4.- Amplification par PCR

L'amplification de l'ADNr 16S est réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec un kit Invitrogen, en utilisant deux amorces: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Le mélange réactionnel contient, pour un volume final de 50 µL: tampon PCR 1X (Tris-HCl 10 µM, KCl 50 µM, pH 9,0 à 25°C); MgCl₂: 1,5 µM; dNTP: 200 mM; 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 (Toumatia, 2010):

- Une étape initiale de dénaturation à 98°C pendant 3 min, suivie de l'addition de Taq polymérase.
- 30 cycles d'amplification à 94°C pendant 1 min, 52°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min.
- Une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min.

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

5.5.- Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage est effectué par le laboratoire MilleGen (Toulouse, France) dans un séquenceur automatique. Les amorces sont les mêmes que celles utilisées lors de la PCR. Une fois la séquence déterminée, elle est comparée à celles des espèces de référence disponibles dans les banques génomiques de données en utilisant le "NCBI Blast" disponible sur Internet au niveau du site Web: ncbi.nlm.nih.gov aussi bien qu'avec le serveur d'EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2012), un outil basé sur le WEB pour l'identification des procaryotes basé sur des séquences. Cette comparaison permettra d'évaluer les pourcentages de similarité entre les séquences de nos souches et celles de gène de l'ARNr 16S des souches types (figure 6).

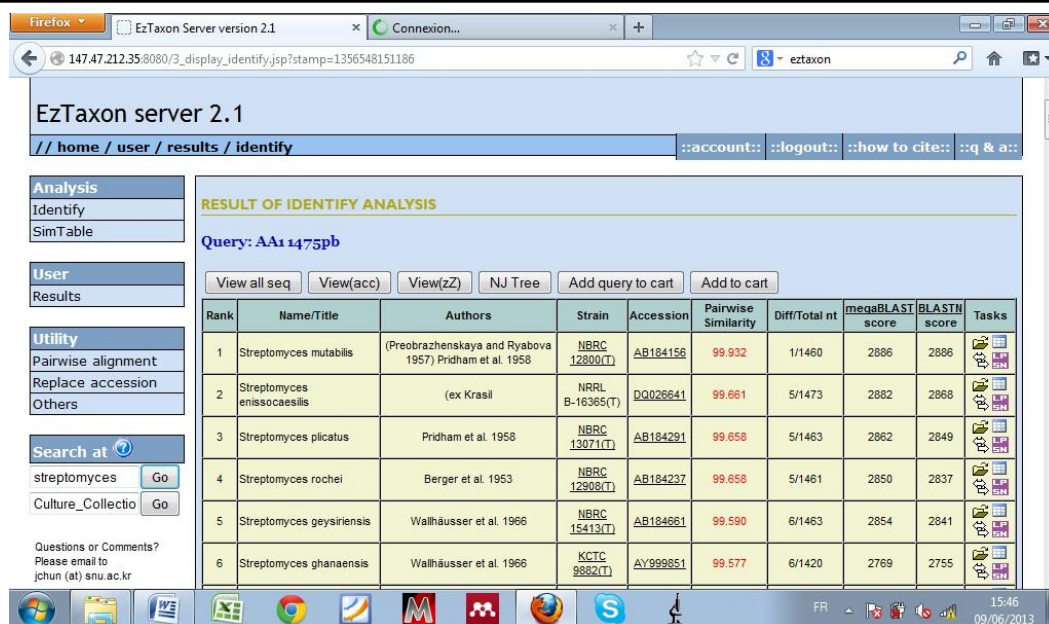


Figure 6 : Fenêtre du serveur EzTaxon 2.1 montrant un blast de séquence.

5.6.- Analyses phylogénétiques

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

Les séquences sont alignées grâce au logiciel « MEGA 5.0 » (figure 7). Les analyses phylogénétiques sont effectuées par les méthodes de calcul des matrices de distances d'évolution de Jukes et Cantor (1969) et en utilisant les méthodes de "Neighbor-Joining" (Saitou et Nei, 1987) pour les algorithmes de construction de topologie des arbres phylogénétiques. La méthode de validation statistique des liens phylogénétiques établis est le Bootstrap (Felsenstein, 2005).

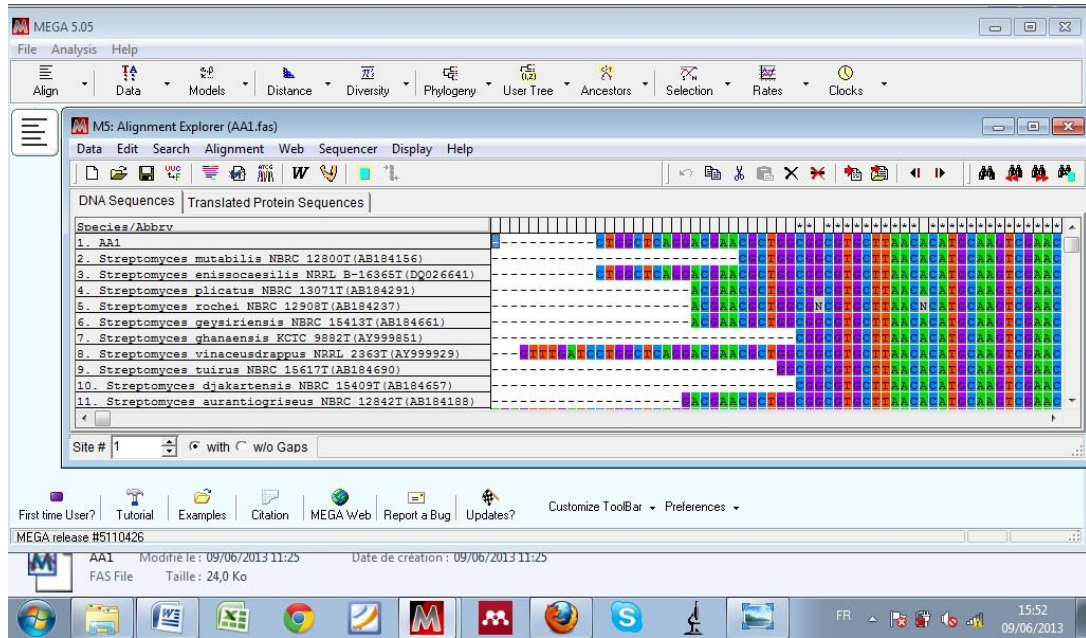


Figure 7 : Fenêtre du logiciel MEGA 5.05 avec l'explorateur de l'alignement des séquences.

IV.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES

1.- Protocole général d'étude des antibiotiques

Nous avons suivi le protocole suivant pour étudier les activités antibiotiques:

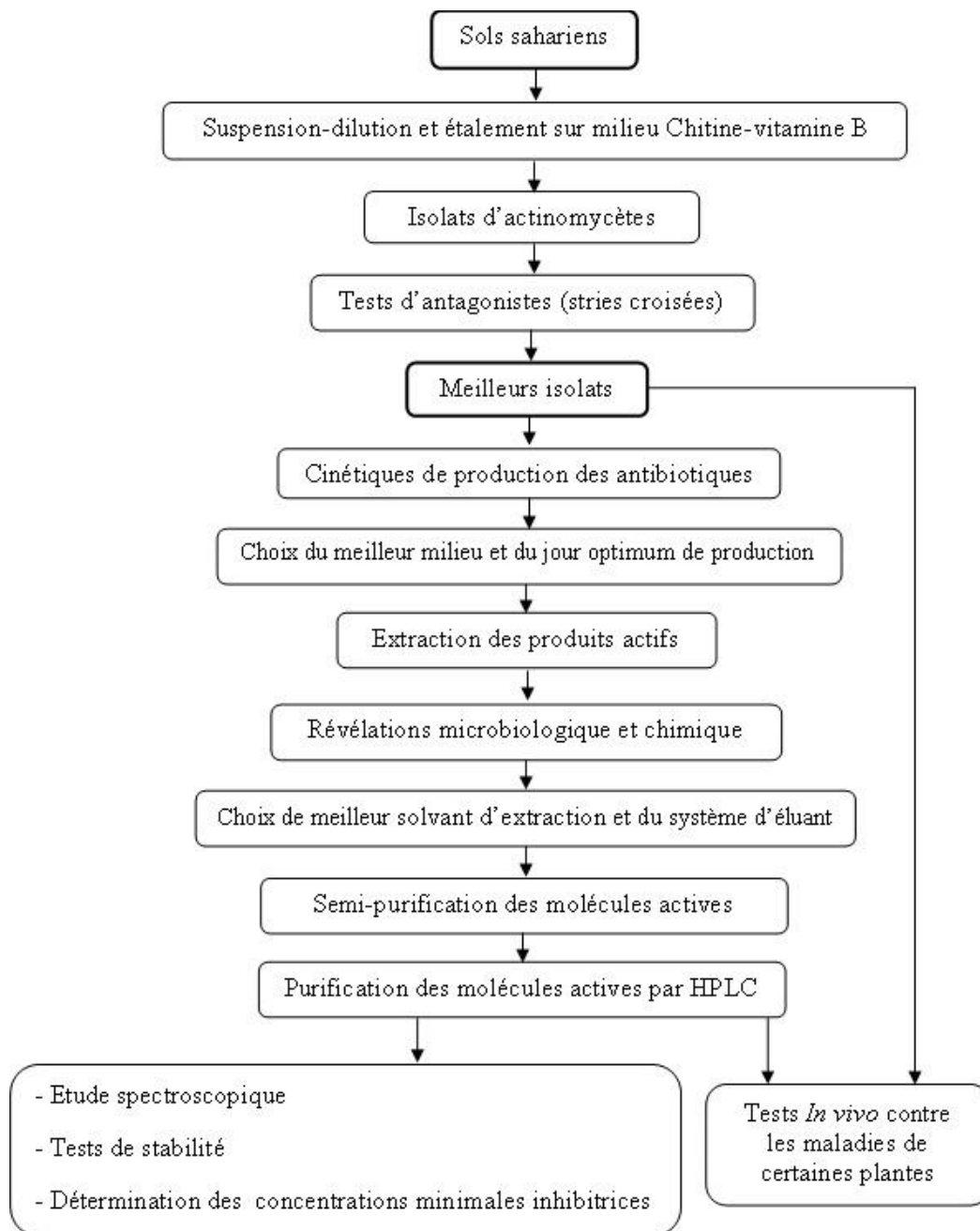


Figure 8 : Protocole général montrant l'isolement, les tests d'antagonisme, les études des antibiotiques et les essais de lutte contre les maladies des plantes par les isolats d'actinomycètes (Toumatia, 2010).

2.- Les isolats d'actinomycètes

Les isolats d'actinomycètes présentant une activité antifongique intéressante sont sélectionnés et le meilleur est retenu pour une étude approfondie de ses antibiotiques.

3.- Technique des stries croisées

L'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes est évaluée par la méthode des stries croisées sur le milieu ISP2. Cette méthode consiste à ensemencer la souche d'actinomycète en un seul trait à la surface du milieu solide et en bordure de la boîte de Pétri (diamètre = 9 cm). Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les souches-cibles sont ensemencées perpendiculairement à l'actinomycète. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures de la souche-cible et de la souche d'actinomycète, après 24 h d'incubation pour les bactéries et les levures et 36 à 48 h pour les champignons.

4.- Cinétique de production et détection des antibiotiques en milieux liquides

Cette étude a été réalisée sur les cinq meilleures souches d'actinomycètes, celles ayant montré une activité antibiotique intéressante lors des tests préliminaires.

4.1.- Milieux de culture

Deux milieux de culture complexes sont utilisés: l'ISP2 et le milieu Bennett (voir annexe 1).

4.2.- Pré-cultures

Pour obtenir les pré-cultures, les spores sont raclées à partir d'une culture en boîte de Pétri de la souche d'actinomycète âgée de 7 jours, et inoculés dans des tubes à vis contenant 3 mL de chaque milieu désiré à inoculer par la suite. Après 48 h d'incubation dans un shaker (250 rpm; 30°C), les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production.

4.3.- Cinétique de production des antibiotiques

La cinétique de production des antibiotiques a été réalisée en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées et de comparer cette production entre les milieux de culture sélectionnés. Des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant chacune 100 mL de milieu (pH 7,2) sont ensemencées avec 3 mL de la pré-culture. Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 250 rpm dans un Shaker. Des prélèvements sont effectués toutes les 24 h pendant 10 jours pour être analysés. L'évolution de l'activité antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement.

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode de diffusion des puits contre *Bacillus subtilis*, *Mucor ramannianus*, *Fusarium culmorum* et *F. oxysporum* f. sp. *lini*.

Dans cette méthode, du milieu ISP2 contenant 12 g/L d'agar en surfusion est pré-ensemencé avec le germe-cible avant d'être coulé en boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Une aliquote de 0,2 mL de surnageant de culture à analyser, est prélevée stérilement puis introduite dans le puits. Les boîtes sont mises 4 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant

Chapitre II - Matériel et méthodes

momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits après 24 h (pour les bactéries et les levures) et 48 h (pour les champignons).

L'évolution de la biomasse durant la fermentation est estimée selon la méthode de Pfefferle *et al.*, (2000). Pour cela, 2 ml de culture sont prélevés tous 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. Le culot (biomasse) est lavé par centrifugation à 3 reprises avec de l'eau distillée. Les tubes sont ensuite incubés à 100°C durant 24 h puis pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare.

5.- Extraction des antibiotiques

L'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de culture est réalisée à l'aide de divers solvants organiques, après une durée (définie lors des expériences précédentes) correspondant à la production optimale de ces substances. L'extraction est effectuée également à partir de la biomasse mycélienne.

5.1.- Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Quatre solvants de polarité croissante sont testés (index de polarité): le *n*-hexane (00), le dichlorométhane (3,1), le *n*-butanol (4) et l'acétate d'éthyle (4,4). Les cultures sont réalisées en milieux ISP2 ou Bennett (selon les souches) (au total, 500mL par milieu) dans les mêmes conditions que celles évoquées précédemment (paragraphe 4.3., page 33), à savoir: erlenmeyer de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu; pH = 7,2; agitation = 250 rpm; température = 30°C. Après 8 jours d'incubation, les filtrats sont répartis en 4 fractions de 100 mL extraites chacune avec 100 mL de solvant. Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses, puis déshydratée par passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant du sulfate de sodium anhydre, afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les extraits sont concentrés à sec puis repris dans du méthanol et testés pour leur antagonisme par la méthode des disques de papier. Les extraits sont spotés à raison de 60 µL pour *B. subtilis* et 80 µL pour *M. ramannianus*, *F. culmorum* et *F. oxysporum* f. sp. *lini*. La phase aqueuse est également testée par antibiographie (même conditions) pour estimer l'activité résiduelle non extraite.

5.2.- Extraction à partir du mycélium

Le mycélium est récupéré après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation (3000 g). Le culot mycélien est récupéré dans une fiole et immergé dans du méthanol. Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante (Mechlinski and Schaffner,

Chapitre II - Matériel et méthodes

1974). L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium est réalisée avec du méthanol: 200 mL de MeOH pour 50 g de mycélium lavé à l'eau distillée et égoutté. L'extrait méthanolique est débarrassé du mycélium par centrifugation, puis concentré à sec à 40°C à l'aide d'un rotavapor. Les activités sont recherchées par la méthode des disques de papier.

6.- Tests d'antibiographie

Les différents extraits organiques obtenus à partir des filtrats ou du mycélium, ainsi que les phases aqueuses, sont testés pour vérifier leurs activités antimicrobiennes. La méthode utilisée est celle des puits et celle des disques de papier.

Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 50 µL à 80 µL d'extrait à tester. Ils sont séchés pour faire évaporer le solvant, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 min. Les disques imprégnés sont ensuite déposés à la surface du milieu ISP2 contenant 12 g/L d'agar, pré-ensemencé avec le germe-cible et coulé en boîtes de Pétri. Celles-ci sont mises à 4°C pendant 4 h avant d'être incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

7.- Révélation microbiologiques et chimiques des antibiotiques

7.1.- Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice sont préparées avec 25 g de silice GF254 (Fluka) dans 60 mL d'eau distillée dans une fiole Erlenmeyer de 250 mL. Après une forte agitation (30 s environ), le gel obtenu est étalé de manière uniforme sur des plaques en verre (20 × 20 cm ou 10 × 20 cm) à l'aide de l'étaleur de Desaga réglé pour 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont ensuite séchées à 40°C pendant une nuit et régénérées à 105°C avant utilisation.

7.2.- Dépôt des échantillons et développement des plaques

À l'aide d'une microsiringue, les échantillons sont déposés sur la plaque sous forme de spots par petites fractions. Les plaques sont ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système de solvant.

Les systèmes de solvants utilisés sont:

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

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

7.3.- Révélations microbiologiques des antibiotiques: bioautographies

La méthode utilisée est celle de Betina (1973). Les plaques sont placées sur un support en verre dans une boîte en polyéthylène (22 × 24 cm) nettoyée à l'éthanol. Au fond de la boîte, une feuille de papier filtre imbibée d'environ 30 mL d'eau stérile permet de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est alors stérilisé durant 30 à 45 min sous UV à 254 nm.

Un volume de 50 mL d'ISP2 à 7 g/L d'agar en surfusion (45 à 50°C) est inoculé avec 2 mL d'une suspension dense du germe-cible. Le milieu est uniformément réparti avec une pipette stérile sur les plaques. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans le milieu puis incubées à 30°C. Le microorganisme-cible se développera sur toute la plaque, sauf au niveau de la zone de migration des antibiotiques (auréole claire d'inhibition). Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 à 48 h et les Rf calculés pour chaque tache active selon la formule:

$$Rf = \frac{\text{Distance de migration de la tache active (en cm)}}{\text{Distance de migration du solvant (en cm)}}$$

7.4.- Révélations chimiques des antibiotiques

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

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

- la ninhydrine: révélateur des fonctions amines.
- le naphtoresorcinol-H₂SO₄: révélateur des glucides.
- la vanilline-H₂SO₄: révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.
- le chlorure de fer ferrique: révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.
- le formaldéhyde-H₂SO₄: révélateur des composés aromatiques polycycliques.
- le réactif de Dragendorff: révélateur des composés hétérocycliques alcaloïdes.

Les taches colorées peuvent apparaître à froid et/ou à chaud (5 min à 100°C). Les méthodes détaillées sont données en annexe 2.

8.- Semi-purification des antibiotiques

Des semi-purifications des antibiotiques à partir de l'extrait organique brut sont effectuées selon deux méthodes:

8.1.- Par chromatographie sur colonne de gel de séphadex LH-20

Le gel de séphadex LH-20 (Fluka) est utilisé pour la purification de l'extrait organique de la souche d'actinomycète sélectionnée. Ce gel est équilibré avec du méthanol et déposé dans une

Chapitre II - Matériel et méthodes

colonne de 50 cm × 2 cm de façon à avoir une longueur de gel de 40 cm. Des aliquotes de 1 à 2 mL du concentré de l'extrait organique brut sont ensuite déposées en surface et passées à travers le gel en utilisant une phase mobile composée de 75% de méthanol dans l'eau (mode isocratique, à pression atmosphérique, débit 1,2 mL/min). Les fractions sont d'abord récoltées dans des tubes à raison de 5 mL par tube, puis récupérées en fonction des couleurs des bandes formées lors de la séparation. Les fractions actives sont localisées par antibiographie contre *Bacillus subtilis*, *Mucor ramannianus* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

8.2.- Sur plaques épaisses de gel de silice

Les antibiotiques de l'extrait organique brut sont semi-purifiés sur couche épaisse de gel de silice GF254 (0,5 mm d'épaisseur) par chromatographie préparative et ce, dans le but d'avoir des quantités suffisantes d'antibiotiques pour les études ultérieures.

Dans ce cas, des plaques de 20 cm de côté sont préparées de la même manière que les plaques fines. 250 à 400 µL de chaque extrait concentré sont déposés en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci sont ensuite développées dans l'éluant sélectionné au cours de l'étude bioautographique, afin de localiser avec précision les bandes actives (une bioautographie est toujours réalisée en parallèle). Une fois la migration terminée, la silice correspondant aux zones actives est alors grattée. Les antibiotiques sont désorbés dans 100 à 200 mL de méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice est par la suite éliminée après filtration sur verre fritté n° 4. Le filtrat méthanolique limpide est recueilli et son activité est contrôlée par antibiographie contre les microorganismes évoqués précédemment. Il est évaporé à sec puis conservé à - 20°C dans un congélateur pour pouvoir par la suite subir une purification finale par HPLC.

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

Avant d'effectuer la purification des fractions semi-pures actives, nous avons voulu avoir une idée sur la stabilité de ces dernières en fonction du pH, de la température et de la lumière. Cette étude a été effectuée sur des produits semi-purs solubilisés dans un mélange de méthanol (10%) et d'eau distillée (90%) à raison de 1 mg/mL. L'activité antibiotique des échantillons traités a été testée par antibiographie sur disques contre *F. o. lini*.

9.1.- Stabilité en fonction du pH

Des fractions de 5 mL de solution active sont ajustées à différents pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12) avec du NaOH (0,1 N et 1 N) ou du HCl (0,1 N et 1 N). Les piluliers sont laissés 24 h à 20°C à l'obscurité. Les pH sont ensuite ramenés à la neutralité et les extraits, testés par antibiographie contre les germes cibles.

9.2.- Stabilité en fonction de la température

Des fractions de 5 mL (placées dans des conditions optimales de pH d'activité) sont soumises aux traitements thermiques suivants: 60 min à 50°C, 30 min à 70°C, 15 min à 100°C et autoclavage durant 10 min à 120°C. Les échantillons sont refroidis à température ambiante et testés ensuite contre les germes cibles. La fraction n'ayant pas subi de traitement thermique constitue le témoin.

9.3.- Stabilité à la lumière

Des tubes contenant chacun 5 mL de la solution active (pH 7, température = 20°C) 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 contre les germes cibles et comparée à celle des témoins (l'un conservé à l'obscurité et l'autre à la lumière du jour).

10.- Purification par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée comme dernière étape de purification des antibiotiques. L'appareil utilisé est de type Jasco, équipé des composants suivants:

- Dégazeur.
- Système de pompe 2055.
- Injecteur automatique (Autosampler) relié à une boucle d'injection de 100 µL.
- Détecteur (UV-Vis 545V à barrette de diode à longueur d'onde UV-visible variable).
- Colonne analytique en phase inverse (C18) INTERCHIM, de 15 µm de granulométrie, 300 mm de longueur et 7,8 mm de diamètre intérieur (DI). Cette colonne est précédée d'une pré-colonne de garde de 10 x 4 mm.
- Le contrôle du gradient de solvant d'élution, la collection des données et l'intégration des pics sont assurés par un ordinateur de type HP équipé d'un logiciel d'exploitation et d'analyse (Interchem).

Les conditions de purification ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires. Le débit d'élution utilisé est fixé à 1 mL min⁻¹ et la température de la colonne. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 8 min (le temps mort de la colonne). Lorsque la colonne est équilibrée, 40 µL de l'échantillon de produit semi pur provenant de l'extrait butanolique sont injectés et analysés. Le gradient utilisé est linéaire de 50 à 100% méthanol/eau pendant 30 min (Tableau 6).

Tableau 6. Programme du gradient d'éluion par HPLC

Temps (min)	Eau	MeOH
0	50	50
30	0	100
35	0	100
40	50	50

11.- Etudes spectroscopiques des antibiotiques

11.1.- Spectroscopie UV-visible

Le spectre UV-visible est déterminé en premier lieu sur les extraits butanoliques bruts, pour noter la présence ou non de polyènes (extractibles par le *n*-butanol), lesquels présentent trois maxima caractéristiques (voir partie bibliographique). Par la suite, le spectre est déterminé pour l'antibiotique purifié. Dans les deux cas, l'extrait est solubilisé dans du méthanol pour HPLC qui est utilisé comme témoin aussi, puis analysé à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU UV 260, précédemment étalonné avec du méthanol.

11.2.- Spectrométrie de masse

La technique utilisée est celle de "Nano-Electrospray Ionisation" ou (= Nano-ESI-IT-MS) qui permet de déterminer le poids moléculaire (PM) des antibiotiques ainsi que ceux des fragments qui en résultent après ionisation des ions parents. Lors de cette analyse, le détachement des noyaux stables résistants à la fragmentation et qui possèdent des masses correspondant généralement à des groupements bien connus, permettent souvent de retracer la séquence de fragmentation de la molécule de l'antibiotique et d'aboutir à la structure ou une hypothèse de structure très proche.

Cette étude est réalisée sur un spectrophotomètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San Jose, CA) et la technique de Nano-ESI-IT-MS permet d'analyser de très faible quantité de produit. Dans notre cas, 5 µl d'une solution de méthanol (qualité HPLC) contenant quelques microgrammes de l'antibiotique, ont été utilisés. L'analyse est réalisée en mode positif et en mode négatif. La fragmentation progressive des ions parents est suivie jusqu'à épuisement du produit. Le programme d'analyse utilisé est Xcalibur 1.2 de ThermoDuest (San Jose, USA).

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE I

**ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES DES SOLS SAHARIENS
ET EVALUATION DE LEUR POTENTIEL ANTIFONGIQUE ET ANTIBACTERIEN**

I.- ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES

L'isolement des actinomycètes a été effectué sur les milieux chitine-vitamines B (Ch-VB) et avec 5 antibiotique sont ajoutés (voir matériel et méthodes, page 23) pris un à un, à des concentrations précises.

Les colonies qui ont montré, après observation à l'œil nu et au microscope optique, les caractéristiques morphologiques des actinomycètes, en particulier la formation du mycélium aérien et du mycélium de substrat avec des filaments très fins, sont considérées comme des actinomycètes.

Sur 85 isolats d'actinomycètes retrouvés dans les 14 échantillons analysés, 78 présentent les caractéristiques macro et micromorphologiques des *Streptomyces* et 7, ceux de divers autres genres. Parmi ces derniers, nous avons noté la présence possible de *Nocardiopsis/Saccharothrix* et de nocardioformes (*Nocardia* et genres apparentés). Parmi les isolats ayant un potentiel d'antagonisme, 5 isolat ont été retenus : AA1 (Ain Amenas) D5, D22, D54 (Djelfa) et B31 (Boussaada). Les 5 isolats d'actinomycètes présentent les caractéristiques macro et micromorphologiques des *Streptomyces*.

II.- EVALUATION DU POTENTIEL ANTIMICROBIEN DES ACTINOMYCETES

Le résultat du screening réalisé sur les 85 isolats d'actinomycètes contre les champignons *F. culmorum*, *Mucor ramannianus*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Escherichia coli* ont montré que 28 isolats sont avec un potentiel antifongique. Les résultats de screening et des isolats ayant un spectre large nous ont orientés vers le choix de 5 isolats pour étendre les tests d'antagonisme sur autre germes cibles.

Sur les 28 isolats ayant une activité antibiotique, 26 présentent les caractéristiques micromorphologiques du genre *Streptomyces*, 1 du genre *Actinomadura* et 1 du genre *Streptosporangium*. Ces 28 isolats proviennent du milieu chitine-vitamines B sans antibiotiques (24 isolats), avec rifampicine (6 isolats), pénicilline (2 isolats), streptomycine (2 isolats) et chloramphénicol (1 isolat).

Les profils d'activité contre les germes cibles des cinq isolats d'actinomycètes sélectionnés sont illustrés par le tableau 7. L'isolat AA1 est sans contexte celui qui est le plus actif (activité très forte surtout contre les champignons testés). Les isolats B31, D5, D22 et D54 sont aussi intéressants pour leur action très forte principalement contre champignons. Le choix des

Chapitre III – Résultats et discussions

actinomycètes ayant une activité antibactériens a été fait pour limiter la probabilité d'avoir des souches productrices des antibiotiques polyéniques.

Tableau 7. Action d'antagonisme des souches d'actinomycètes*.

Germes cibles	Distances d'inhibition par les souches d'actinomycètes (mm) [†]				
	AA1	B31	D5	D22	D54
Champignons filamenteux					
<i>Botrytis cinerea</i> 1 (féverole)**	40 ± 0,82	28,67 ± 3,86	16,00 ± 3,74	19,33 ± 0,94	11,33 ± 1,89
<i>B. cinerea</i> 2 (vigne)**	38,67 ± 0,47	27,00 ± 4,08	15,67 ± 2,87	16,33 ± 1,25	9,00 ± 2,16
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	34,67 ± 0,47	24,67 ± 1,70	12,33 ± 0,94	11,67 ± 1,25	4,33 ± 0,47
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	40,33 ± 0,47	28,33 ± 3,09	15,67 ± 3,30	9,67 ± 2,05	7,33 ± 2,05
<i>F. culmorum</i> F3288	41 ± 0,82	29,67 ± 3,30	11,67 ± 2,87	14,33 ± 4,03	6,67 ± 2,36
<i>F. graminearum</i> F5883	40,33 ± 2,62	28,67 ± 3,40	12,33 ± 4,03	12,67 ± 2,05	9,67 ± 2,05
<i>F. sporotrichoides</i> F13440	35,33 ± 2,87	32,33 ± 2,05	13,33 ± 2,36	11,67 ± 2,36	12,00 ± 2,45
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	45 ± 0	40,33 ± 2,05	19,00 ± 4,32	20,33 ± 1,70	14,33 ± 0,94
<i>A. niger</i>	42,33 ± 3,09	41,00 ± 2,16	18,67 ± 3,40	17,67 ± 2,36	10,33 ± 1,25
<i>A. flavus</i> NRRL 3251	23 ± 2,16	16,33 ± 2,62	7,67 ± 2,05	9,00 ± 2,94	12,33 ± 2,05
<i>A. ochraceus</i> ATCC 3174	30,33 ± 1,70	25,67 ± 2,62	14,00 ± 2,83	13,67 ± 3,09	13,67 ± 3,09
<i>A. parasiticus</i> CBS 100926	19,33 ± 4,78	17,67 ± 3,77	13,33 ± 1,89	11,67 ± 3,68	8,00 ± 1,41
<i>Penicillium glabrum</i>	24,33 ± 3,68	23,33 ± 2,87	11,00 ± 2,16	14,00 ± 2,45	11,00 ± 2,16
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	44,33 ± 0,47	38,33 ± 2,87	21,67 ± 2,36	10,33 ± 1,70	13,00 ± 2,16
Levures					
<i>Candida albicans</i> IPA 200	31 ± 3,61	26,33 ± 1,53	6,67 ± 1,53	4,33 ± 2,08	3,33 ± 1,15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	44,33 ± 0,58	32,00 ± 2,65	9,33 ± 1,15	4,33 ± 2,08	4,33 ± 0,58
Bactéries à Gram positif					
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	44,67 ± 0,58	44,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00	12,67 ± 1,15	12,67 ± 2,08
<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 82110	24 ± 2,00	24,00 ± 2,00	0,00 ± 0,00	3,33 ± 0,58	11,67 ± 1,15
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	44 ± 1,00	44,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Bactéries à Gram négatif					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	44,67 ± 0,58	44,67 ± 0,58	6,33 ± 1,15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> n° 2410	44,67 ± 0,58	44,67 ± 0,58	8,33 ± 3,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Pseudomonas syringae</i> n° 1882	44,33 ± 1,15	44,33 ± 1,15	9,67 ± 2,89	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

*Méthode des stries croisées sur milieu ISP2 solide. Activité estimée par la distance d'inhibition entre l'actinomycète et les bords des microorganismes cibles.

**Plante hôte à partir de laquelle *Botrytis cinerea* a été isolé.

† Les données illustrées sont les valeurs moyennes de trois répliquations ± écarts types.

L'activité de l'isolat AA1 (figure 9) est généralement très forte. Le spectre est large et s'étend sur tous les champignons filamenteux testés, aussi bien ceux qui sont phytopathogènes

Chapitre III – Résultats et discussions

(*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *F. culmorum*, *Botrytis cinerea*, etc.) que ceux qui sont toxinogènes. De plus, une forte activité est également notée contre les bactéries pathogènes et les levures dont *Candida albicans*.

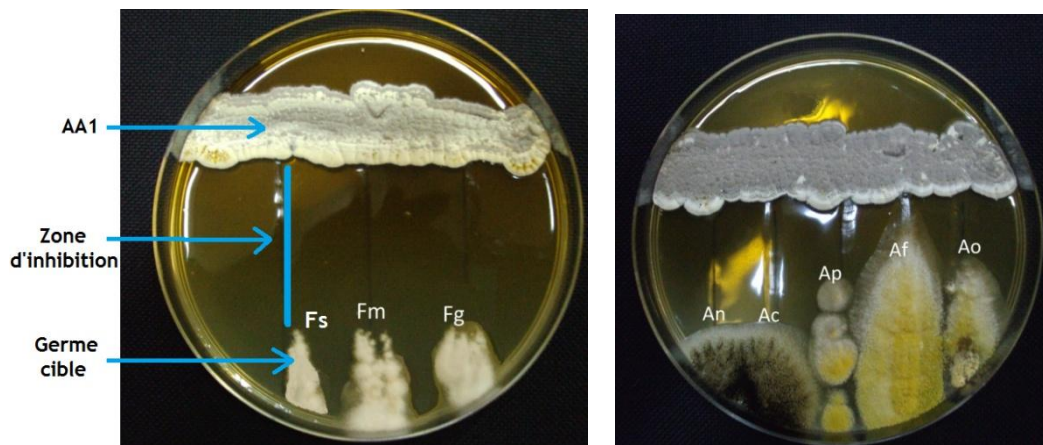


Figure 9 : Activité antifongique de la souche AA1 sur milieu ISP2.

Note. Fs: *Fusarium sporotrichoides*; Fm: *F. moniliforme*; Fg: *F. graminearum*; An: *Aspergillus niger*; Ac: *A. carbonarius*; Ap: *A. parasiticus*; Af: *A. flavus*; Ao: *A. ochraceus*.

Les isolats D5, D22 et D54 présentent des activités contre tous les champignons et les levures testés (Tableau 7). Cependant, cette activité est moins forte que celle de l'isolat AA1. L'activité contre *Botrytis cinerea* est modérée. En plus de cette activité antifongique, l'isolat D54 est antagoniste de *B. subtilis* et *L. monocytogenes*, mais pas de *S. aureus*, ni des bactéries à Gram négatif testées. L'isolat D22 est également inactif contre les bactéries à Gram négatif testées. Par contre l'isolat D5 n'a pas d'activité contre les bactéries à Gram positif.

L'isolat B31 présente un spectre d'action qui touche tous les groupes de microorganismes que nous avons testés. Les microorganismes les plus sensibles sont *A. carbonarius*, *A. niger*, *B. subtilis*, *S. aureus* et les bactéries à Gram négatif. Tout comme pour les autres isolats, l'activité de B31 est moindre que celle de AA1.

III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Les actinomycètes ont été recherchés dans 14 sols provenant de 3 régions sahariennes.

Le choix de ces régions est basé sur les résultats intéressants, du point de vue quantité et diversité des actinomycètes, obtenus par plusieurs chercheurs de notre laboratoire (Sabaou *et al.*, 1992 et 1998; Boudjella, 1994; Zitouni *et al.*, 2004a,b et 2005; Badji *et al.*, 2006 et 2007; Lamari, 2006; Toumatia, 2010; Toumatia *et al.*, 2013), Ces travaux ont montré la richesse de ces régions en actinomycètes qui parfois dépassent les autres groupes de microorganismes en densité.

Chapitre III – Résultats et discussions

L'isolement des actinomycètes est effectué sur le milieu de culture chitine-vitamines B préconisé par différents auteurs (Hayakawa et Nonomura, 1984; Boudjella, 1994; Pathom-aree *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Meklat, 2012) qui est à base de sels minéraux et de chitine comme unique source de carbone et d'azote. Ce substrat est l'élément sélectif qui favorise la croissance des actinomycètes au détriment des bactéries non mycéliennes. En effet, les actinomycètes dégradent mieux la chitine par rapport aux autres microorganismes qui la dégradent difficilement ou pas. Ce milieu contient aussi des vitamines du groupe B comme facteurs de croissance et cela permet aux genres relativement rares et qui sont souvent auxotrophes pour ces vitamines de croître (Hayakawa et Nonomura, 1984).

De plus, l'effet des antibiotiques additionnés au milieu a permis la réduction du nombre et de la taille des colonies de bactéries et de champignons invasifs, gênants pour la croissance des actinomycètes et non recherchés dans notre étude. Bien que l'ajout d'antibiotiques sélectifs soit souvent utilisé pour l'obtention de genres et taxa d'actinomycètes rares (Boudjella, 1994) autres que les Streptomycètes qui sont dominants dans les sols (Sabaou *et al.*, 1998), nous l'avons utilisé dans ce cas dans l'espoir d'avoir des isolats de *Streptomyces* assez particuliers et qui pourraient être de nouvelles souches productrices de nouveaux antibiotiques

Sur ce milieu, nous avons récolté 85 isolats d'actinomycètes dont 78 de *Streptomyces* qui est le genre dominant et 7 autres appartenant à d'autres genres.

La recherche du pouvoir antifongique chez les isolats sahariens a été effectuée sur milieu solide par la méthode des stries croisées qui est une méthode simple et dont les résultats sont souvent répétitifs et sont dans la majorité des cas reproductibles lors du passage en culture sur milieux liquides. Cette analyse a révélé la production d'antifongiques chez 5 isolats, sont probablement des *Streptomyces*. Ces résultats ne sont pas surprenants sachant que les *Streptomyces* sont les plus réputés pour la production d'antibiotiques, y compris les antifongiques (Barakate *et al.*, 2002). Les *Actinomadura* et *Streptosporangium* sont aussi connus pour la production de ce type de composés comme l'ont déjà signalé Badji (2006) et Boudjella (2007).

Les cinq isolats sont très actifs contre les champignons, levures et bactérie Gram positif et Gram négatif, sauf les isolats D5, D22 et D54 ne sont pas actifs contre les bactéries; D5 n'est pas actif contre les bactéries à Gram positif ; D22 et D54 ne sont pas actifs contre les bactéries à Gram négatif mais ils se sont révélés être les meilleurs producteurs d'antifongiques. Leurs caractéristiques micromorphologiques sont celles des *Streptomyces* et ils ont été isolés avec la rifampicine (AA1 et D5, D54, D22) et la pénicilline (B31). Aucun isolat fortement actif n'a été obtenu dans le milieu de culture sans antibiotique. Ceci justifié donc bien le choix des

Chapitre III – Résultats et discussions

antibiotiques qui ont permis la sélection de souches ou d'espèces de *Streptomyces* très particulières, fortement actives et qui n'ont pas été obtenues sans antibiotiques sélectifs.

En conclusion, nous pouvons dire que le milieu chitine-vitamines B additionné ou non d'antibiotiques sélectifs a permis de sélectionner 85 isolats d'actinomycètes dont 91,70% appartiendraient vraisemblablement au genre *Streptomyces*. La rifampicine et la pénicilline ont permis l'isolement de cinq souches présentant une forte à très forte activité antifongique contre tous les champignons phytopathogènes testés.

PARTIE II

ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES SELECTIONNES

En se basant sur les potentialités antagonistes des isolats d'actinomycètes obtenus (Tableau 7, page 39), nous avons sélectionné les 5 meilleurs, nommés AA1, D5, D22, D54, B31 ayant montré des activités antifongiques intéressantes, pour les étudier tout d'abord du point de vue taxonomique. Parmi ces cinq isolats, AA1 est celui qui a présenté la plus forte activité antifongique.

I.- ETUDE MORPHOLOGIQUE

1.- Caractéristiques culturelles

Les résultats de l'étude macromorphologique des isolats AA1, D5, D22, D54, D55, B31, sont rapportés dans le tableau 8 et la figure 10. Les isolats AA1, D5, D22, D54 et B31 présentent tous une croissance et une sporulation abondantes sur tous les milieux solide ISP2 et ISP3 et ISP4 et Bennet, sauf l'isolat B31 à une production de MA faible et une sporulation nul sur le milieu ISP2.

Pour ce qui est des couleurs, l'isolat AA1 se caractérise par un MA gris clair et un mycélium du substrat (MS) ainsi qu'un pigment soluble (PS) jaune brunâtre à jaune orangé vif selon les milieux.

2.- Caractéristiques micromorphologiques

Les mycélia du substrat des cinq isolats sont ramifiés et ne se fragmentent pas. Les mycélia aériens (figure 11) sont constitués de filaments ramifiés qui se terminent par de longues chaînes de spores (10 à 50 spores par chaîne) portées par des sporophores. Les chaînes de spores sont de types plus ou moins variables selon les souches. Elles sont spiralées (2 à 5 tours), en crochets et en boucles (type SRA) pour l'isolat AA1, type RF pour D5, D22 et D54 (droites et flexueuses, avec 10 à 50 spores) et type S (6 à 8 tours spiralées mais lâches, de 10 à 50 spores) pour B31.

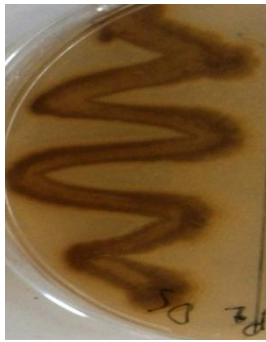
Tableau 8. Caractéristiques culturelles de l'isolat AA1,

Isolats	Milieux de culture	Croissance	Sporulation	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments solubles
AA1	ISP2	++++	++++	++++ Gris clair	Brun jaunâtre, grisâtre ou jaune orangé foncé	+++ Jaune brunâtre
	ISP3	+++	+++	++ Gris-clair	Jaune orangé brunâtre	+++ Jaune orangé vif
	ISP4	+++	+++	++ Gris-clair	Jaune orangé brunâtre à modéré	+++ Jaune orangé vif
	Bennett	+++	+++	+ Blanchâtre	Jaune brunâtre	+++ Jaune brunâtre
	Gélose nutritive	++	+	+ Blanchâtre	Jaune clair	+ Jaune pâle
B31	ISP2	++	-	++++ jaune orangé modéré grisâtre	jaune orangé brillant	-
	ISP3	+++	+++	++ jaune rosâtre	orange clair	+++ Jaune orangé vif
	ISP4	+++	+++	++ jaune rosâtre	orange jaunâtre foncé	+++ Jaune orangé vif
	Bennett	+++	+++	+ rose clair	jaune orangé clair	+++ Jaune brunâtre
D5	ISP2	++++	++++	++++ jaune grisâtre clair	Brun jaunâtre modéré	-
	ISP3	+++	++	++ jaune olivâtre clair	jaune olivâtre	-
	ISP4	+++	++	++ jaune olivâtre clair	brun olivâtre modéré	-
	Bennett	+++	++	++ jaune olivâtre clair	jaune olivâtre	-
D22	ISP2	+++	++++	++++ Gris jaunâtre	jaune foncé	-
	ISP3	+++	+++	+++ gris clair olivâtre	jaune olivâtre foncé	-
	ISP4	+++	+++	+++ gris clair olivâtre	jaune olivâtre foncé	-
	Bennett	+++	+++	+++ gris clair olivâtre	Jaune brunâtre clair	-
	ISP2	++	++	++ jaune grisâtre	jaune brunâtre modéré	-
	ISP3	+++	+++	++ jaune grisâtre	jaune brunâtre vif	-

Chapitre III – Résultats et discussions

D54	ISP4	+++	+++	++ jaune grisâtre	jaune brunâtre modéré	-
	Bennett	+++	+++	+ Gris olivâtre foncé	jaune grisâtre	-

Note. Croissance, sporulation ou production des PS: ++++ = abondante; +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.



D5 MS



D5 MA



D22 MS



D22 MA



D54 MS



D54 MA



B31 MS



B31 MA



AA1 MS

Figure 10 : Macromorphologie des isolats d'actinomycètes étudiés.

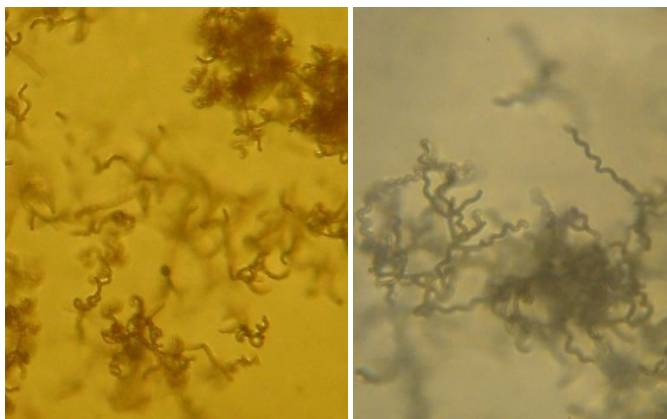


Figure 1 : Micromorphologie (G: x 40) des isolats AA1 et B31 respectivement sur milieu ISP2.

II.- ETUDE CHIMIOTAXONOMIQUE

Les cinq isolats possèdent dans leur paroi l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et la glycine. Les sucres présents dans les cellules sont le ribose, le glucose et le galactose (sucres non caractéristiques). Le phospholipide caractéristique décelé au niveau membranaire est la phosphatidyléthanolamine.

III.- ETUDE PHYSIOLOGIQUE

1.- Isolat AA1

Cette étude a été réalisée de manière plus approfondie pour l'isolat AA1 (Tableau 9) qui s'est révélé être le meilleur antagoniste. Cet isolat utilise la majorité des sucres testés, mais présente une variabilité dans la dégradation des sels des acides organiques, des acides aminés et des autres composés organiques testés. Il ne produit pas de pigments mélanoides, ne croit pas à 15% de NaCl et résiste au chloramphénicol (25 mg/L), à la pénicilline (25 mg/L) et à la rifampicine (10 mg/L).

2.- Isolats D5, D22, D54 et B31

Ces isolats bien utilisés le : glucose, fructose, galactose, mannitol, rhamnose, xylose et sucrose et salicine, cependant l'isolat Bi31 utilise le raffinose et faiblement l'inositol, ainsi l'isolat D5 utilise variablement l'arabinose. (Tableau 10)

Touts les isolats dégradent bien les acides amines et l'amidon, l'xanthine sauf l'isolat B31 ne dégrade pas l'xanthine et l'azide, les isolats D5et B31 dégradent phénol, par contre les autres isolats ne le dégrade pas et aussi l'azide.

Touts les isolats poussent dans les antibiotiques additionnés sur le milieu ; pénicilline et rifampicine, sauf l'isolat B31 ne se croit pas dans le milieu qu'il contient la rifampicine, et capable de se croit à Nacl 10% et NaCl 7%, par contre une variabilité de croissance à NaCl 10% et NaCl 7% pour les autres isolats.

Chapitre III – Résultats et discussions

Dans les milieux ISP6 et ISP7; les quatre isolats ne produisent pas de pigments mélanoides.

Tableau 9. Caractéristiques physiologiques de l'isolat AA1

Tests	Réaction	Tests	Réaction	Tests	Réaction
Dégradation de:		Maltose	+	Décarboxylation des sels de sodium:	
Adénine	+	Mannitol	+	Acétate	-
Amidon	+	Mannose	+	Benzoate	-
Arbutine	-	Raffinose	-	Butyrate	-
Esculine	-	Rhamnose	+	Oxalate	-
Tyrosine	+	Ribose	+	Pyruvate	+
Xanthine	+	Saccharose	+	Succinate	+
		Sorbitol	-	Tartrate	-
Utilisation des glucides et dérivés:		Tréhalose	+		
Adonitol	-	Xylose	+		
		Utilisation des sources d'azote:		Résistance aux antibiotiques (mg/L):	
Arabinose	+	Proline	+	Chloramphénicol (25)	+
Erythritol	+	Sérine	-	Kanamycine (25)	-
Fructose	+			Pénicilline (25)	+
Galactose	+	Production de pigments mélanoides	-		
Glucose	+	Croissance en présence de NaCl à 15% (w/v)	-	Rifampicine (10)	+
				Streptomycine (10)	-
Glycérol	+				
Inositol	+				
Lactose	+				

Note. Test positif : +, test négatif : -

Chapitre III – Résultats et discussions

Tableau 10. Caractéristiques physiologiques des isolats D5, D22, D54 et B31.

Tests physiologiques	D5	D54	D22	B31
Utilisation des glucides et dérivés:				
T	-	-	-	-
Glucose	+++	+++	+++	+++
Arabinose	+-	-	-	-
Fructose	++	+++	+++	+++
Galactose	+++	+++	+++	+++
Inositol	-	-	-	+-
Mannitol	+++	+++	+++	++
Raffinose	-	-	-	+++
Rhamnose	+++	+	+++	+
Salicine	+	++	+	+
Sucrose	+	++	++	+
Xylose	+++	++	+++	+++
Dégradation des acides aminés				
T	++	++	+	+
Histidine	+++	+++	+	+++
Phénylalanine	++	++	+	+++
Proline	+++	+++	+	++
Divers				
Amidon	++	+++	+	+
Xanthine	+	+	+	-
Phénol	+	-	-	+
Azide	+-	-	+-	-
Croissance en présence de:				
T	+++	+++	+++	+++
Pénicilline	+++	+++	+++	+++
Rifampicine	+	+	+	-
NaCl 7%	+-	+-	+-	+
NaCl 10%	+-	+-	+-	+
Production de pigments mélanoides:				
ISP6	-	-	-	-
ISP7	-	-	-	-

Note. Test positif : croissance +++ = bonne; ++ = moyenne ; +- = faible ; - = test négatif

IV.- ETUDE MOLECULAIRE DES ISOLATS

Cette étude n'a été réalisée que pour les isolats AA1, D5, D22 et D54. Après extraction et amplification de l'ADNr 16S, des séquences de longueurs différentes ont été déterminées puis alignées et comparées avec les séquences des bactéries contenues dans les bases de données génomiques. Le test du "BLAST" de la souche AA1 (Tableau 11) montre une similitude de 99,93 % avec l'espèce *Streptomyces mutabilis* NBRC 12800^T (Pridham et al., 1958) qui est la plus proche. L'analyse phylogénétique par la méthode du "neighbor-joining" (voir page 28 de "matériel et méthodes") montre la position de l'isolat AA1 et sa relation avec les souches-types des espèces les plus proches de *Streptomyces* (figure 12).

Chapitre III – Résultats et discussions

Tableau 11. Résultat du blast de la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat AA1 avec celles des souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

Espèce	Souche-type	n° d'accension	Diff/ Longueur d'alignement	% de similarité
<i>S. mutabilis</i>	NBRC 12800 ^T	AB184156	1/1460	99,93
<i>S. enissocaesilis</i>	NRRL B-16365 ^T	DQ026641	5/1473	99,66
<i>S. plicatus</i>	NBRC 13071 ^T	AB184291	5/1463	99,65
<i>S. rochei</i>	NBRC 13071 ^T	AB184291	5/1463	99,65
<i>S. geysiriensis</i>	NBRC 15413 ^T	AB184661	6/1463	99,59
<i>S. ghanaensis</i>	KTCC 9882 ^T	AY999851	6/1420	99,57
<i>S. vinaceusdrappus</i>	NRRL 2363 ^T	AY999929	7/1468	99,52
<i>S. tuirus</i>	NBRC 15617 ^T	AB184690	9/1454	99,38
<i>S. djakartensis</i>	NBRC15409 ^T	AB184657	10/1435	99,30
<i>S. aurantiogriseus</i>	NBRC 12842 ^T	AB184188	13/1463	99,11
<i>S. tendae</i>	NBRC 12822 ^T	AB184172	14/1463	99,05
<i>S. violaceorubidus</i>	LMG 20319 ^T	AJ781374	15/1472	98,97
<i>S. azureus</i>	NBRC 12744 ^T	AB184837	15/1463	98,97
<i>S. asterosporus</i>	NBRC B-24328 ^T	AY999902	16/1472	98,91
<i>S. clavus</i>	ISP 5010 ^T	AY999780	16/1462	98,91
<i>S. vlavoridis</i>	NBRC 12772 ^T	AB184842	16/1462	98,90

*La comparaison de la séquence de l'isolat AA1 avec les espèces de *Streptomyces* a porté sur les nombres de bases indiqués sur la colonne.

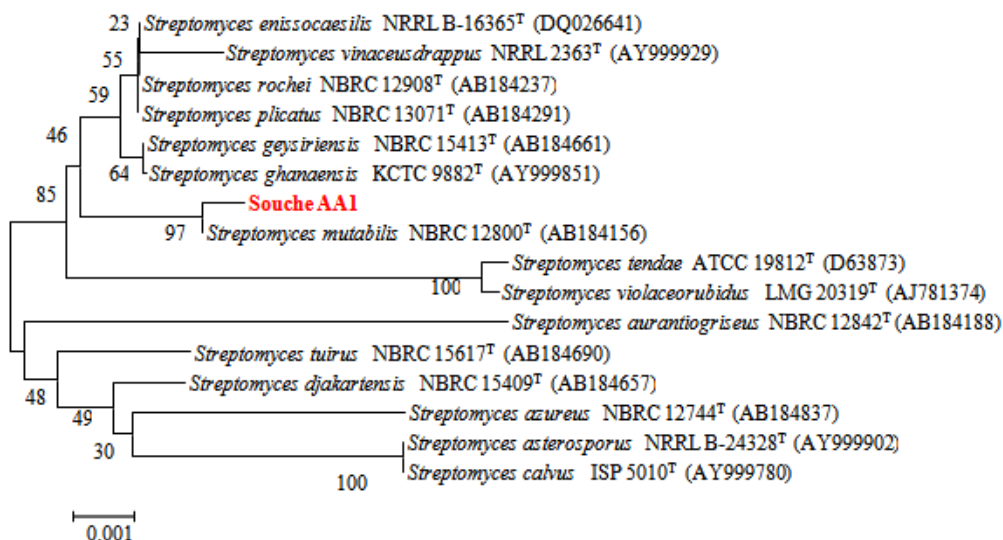


Figure 12 : Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat AA1 et les souches-types des espèces du genre *Streptomyces* les plus proches.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 rééchantillonnages). La barre indique 0,001 substitution par position de nucléotide.

Tableau 12. Position taxonomique des isolats d’actinomycètes selon les séquences de l’ADNr 16S.

*La comparaison des séquences de l’ADNr 16S des isolats avec les espèces de *Streptomyces* a porté sur les nombres de bases différentes sur les bases comparées.

Isolats	Longueur d’alignement*	Espèce	Souche-type	n° d’accession	% de similarité
AA1	1/1460	<i>Streptomyces mutabilis</i>	NBRC 12800 ^T	<u>AB184156</u>	99,93%
B31	-	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-
D5	2/1417	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	<u>JCM 4364^T</u>	<u>AY999770</u>	99.86%
D22	3/1410	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	<u>JCM 4364^T</u>	<u>AY999770</u>	99.79%
D54	7/1399	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	AS 4.1868 ^T	AY999894	99.50%

Le tableau 12 montre les positions et les relations des isolats avec les souches-types des espèces les plus proches de *Streptomyces*. Toutes les séquences ont montré une similitude plus de 99% avec celles des souches types les plus proches. La similarité inférieure à 97% dogmatise que la bactérie appartient à une nouvelle espèce. Mais dans notre cas, les quatre souches AA1, D5, D22 et D54 ont été identifiées comme : *Streptomyces mutabilis*, *S. cyaneofuscatus*, *S. cyaneofuscatus* et *S. griseoplanus*. Les figures 13, 14 et 15 montrent les positions taxonomiques des trois isolats D5, D22 et D54 qui ont les distances génétiques importantes par rapport les souches types les plus proches. La figure 16 montre que la souche AA1 appartient à un groupe (cluster) différent que celui de D5, D22 et D54.

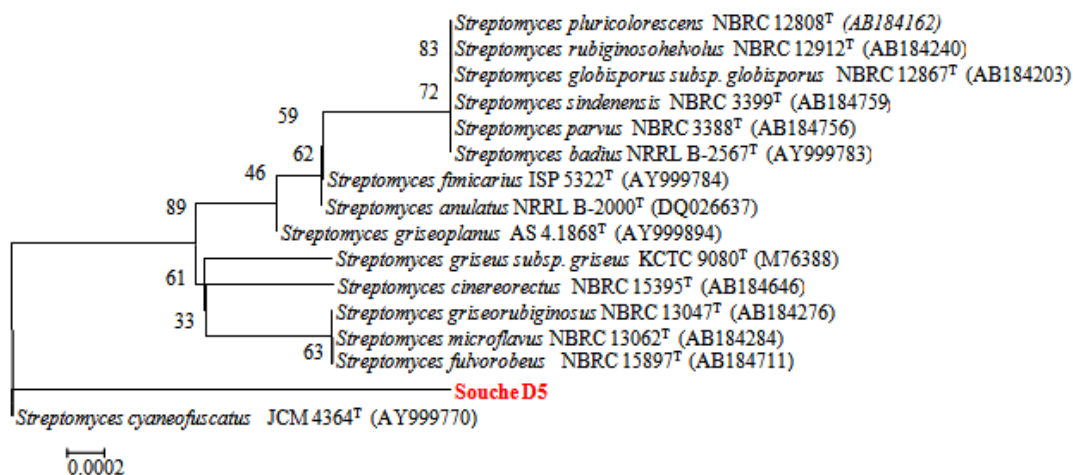


Figure 13 : Arbre phylogénique basé sur l’analyse des séquences de l’ADNr 16S et montrant les relations entre l’isolat D5 et les souches-types des espèces du genre *Streptomyces* les plus proches.

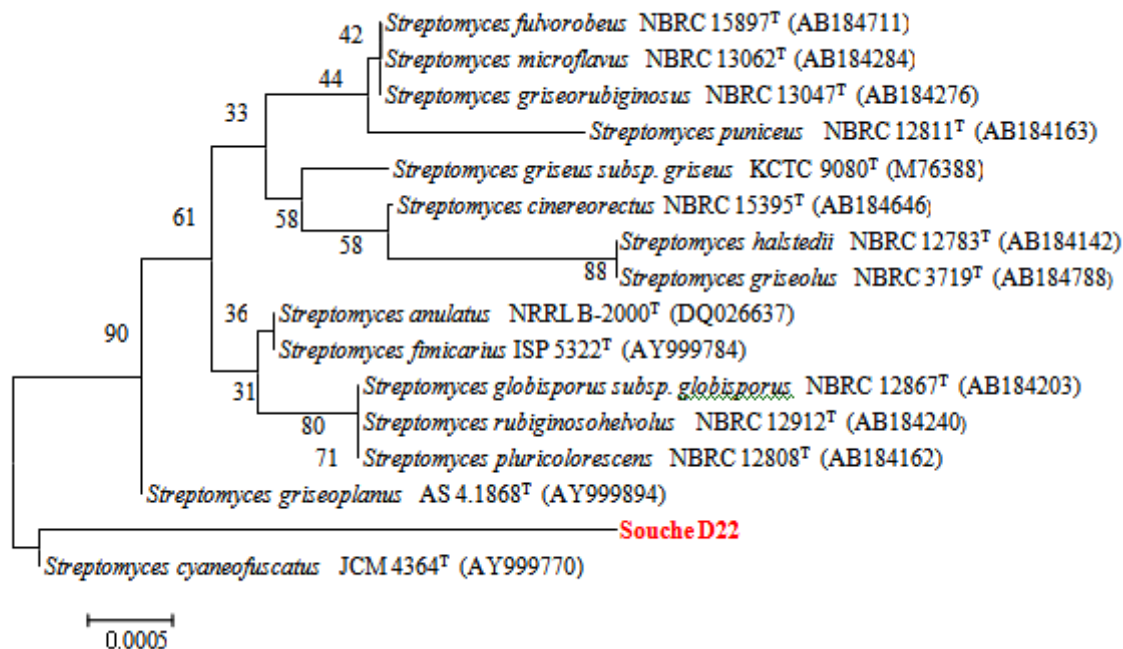


Figure 14 : Arbre phylogénique basé sur l’analyse des séquences de l’ADNr 16S et montrant les relations entre l’isolat D22 et les souches-types des espèces du genre *Streptomyces* les plus proches.

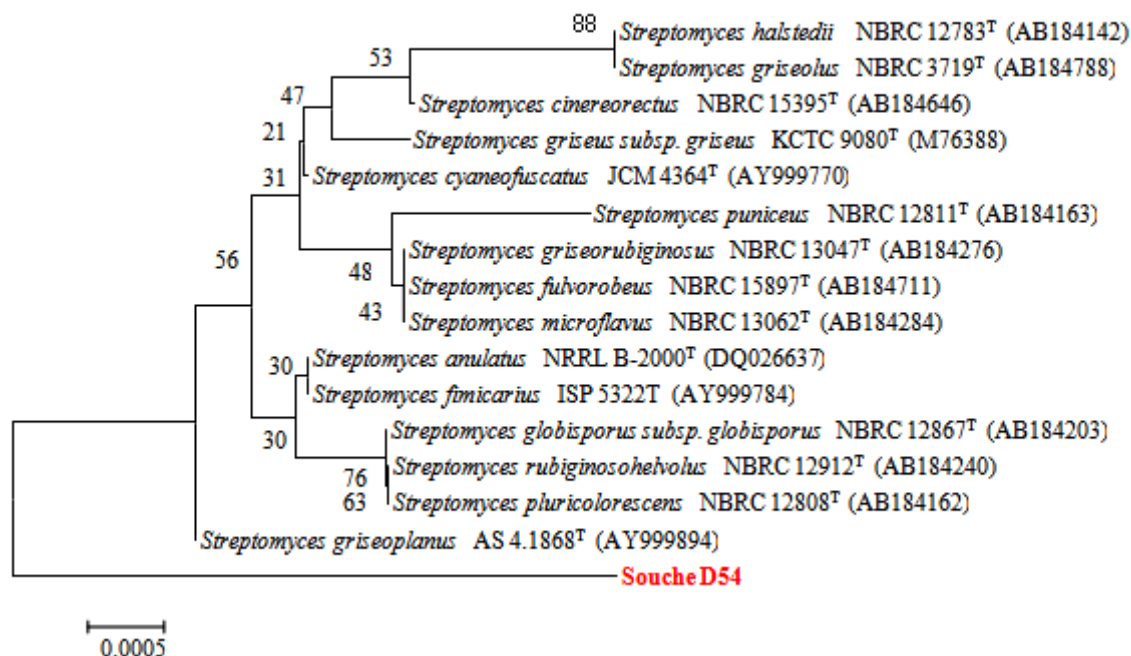


Figure 15 : Arbre phylogénique basé sur l’analyse des séquences de l’ADNr 16S et montrant les relations entre l’isolat D54 et les souches-types des espèces du genre *Streptomyces* les plus proches.

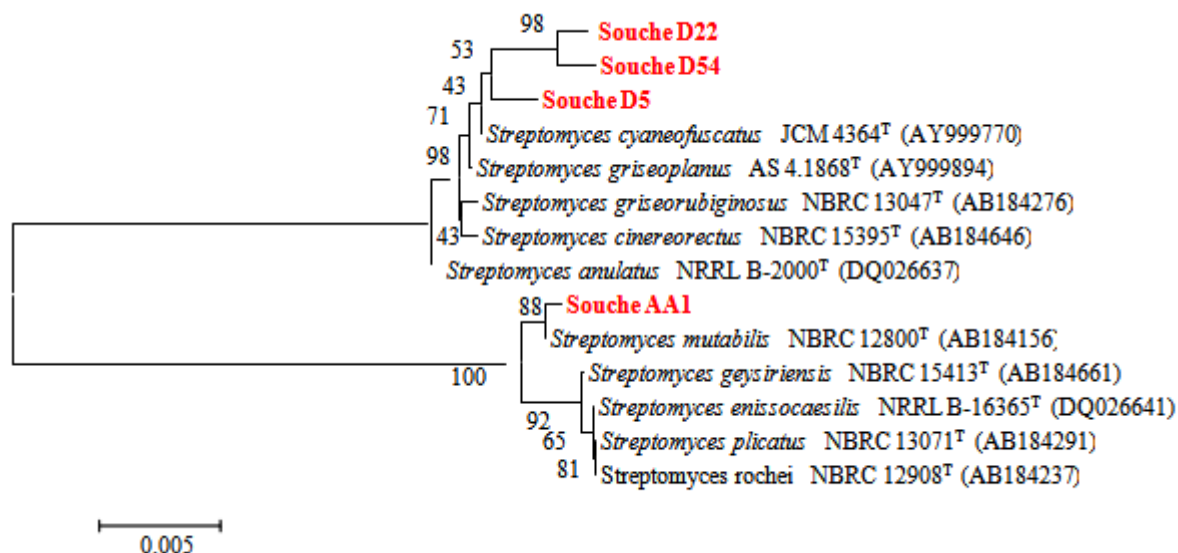


Figure 16 : Arbre phylogénique basé sur l’analyse des séquences de l’ADNr 16S et montrant les relations entre les quatre isolats : AA1, D5, D22 et D54 et les souches-types des espèces du genre *Streptomyces* les plus proches.

V.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Les isolats d’actinomycètes AA1, D5, D22, D54, B31 produisent sur leur mycélium aérien des chaînes de spores portées par des sporophores. La présence dans leurs cellules de l’isomère LL de l’acide diamminopimélique, de la glycine et de sucres non caractéristiques (ribose, glucose et galactose), montre que ces isolats possèdent le chimiotype IC (Lechevalier et Lechevalier, 1970b). la présence de la phosphatidyléthanolamine comme phospholipide diagnostique les classe dans le type PII (Lechevalier *et al.*, 1977).

L’ensemble de ces caractéristiques morphologiques et chimiotaxonomiques permet de rattacher les actinomycètes AA1, D5, D22, D54, B31 au genre *Streptomyces* (Holt *et al.*, 1994). La souche AA1 appartient à un cluster différent que celui des autres trois souches, ce phénomène est normal dans un groupe taxonomique vaste comme *Streptomyces* qui comporte jusqu’à maintenant 630 espèces organisées sous forme des ‘Clades’ (Kämpfer, 2006; Euzéby, 2010).

L’isolat AA1, les données phylogénétiques basées sur le séquençage de l’ADNr 16S ont permis de le rapprocher de l’espèce *Streptomyces mutabilis* (Pridham *et al.*, 1958), avec un taux de similitude de 99,93%. Les données phénotypiques de cette espèce (couleur des mycélium aérien et du substrat, production de pigments mélanoides, morphologie des chaînes de spores et dégradation de 8 sucres) (Shirling et Gottlieb, 1968; Nonomura, 1974) correspondent bien à celle de l’isolat AA1. La seule différence réside en la production d’un pigment soluble jaune-orangé vif chez AA1, lequel est absent chez *S. mutabilis*. Cependant, au vu des taux élevés souvent observés au niveau des séquences de l’ADNr 16S des différentes espèces de *Streptomyces* et qui

Chapitre III – Résultats et discussions

peuvent atteindre parfois même 100% comme c'est le cas entre les deux souches types de *S. pilosus* NBRC 12807^T (Ettlinger *et al.*, 1958) et *S. flavoviridis* NBRC 12772^T (Preobrazhenskaya, 1986), il est toujours indispensable de compléter l'identification par des études d'hybridation ADN-ADN pour enlever toute ambiguïté.

PARTIE III PRODUCTION, EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES ANTIBIOTIQUES

I.- CINETIQUES DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT AA1

1.- Résultats

Les cinétiques réalisées dans les milieux de culture liquides ISP2 et Bennett pendant 10 jours sont illustrées par les figures 17, 18 et 19. La croissance de la souche AA1 est caractérisée par deux périodes importantes d'évolution montrant un phénomène de diauxie sur les deux milieux mais plus nettement visible sur milieu Bennett.

La première période, comprise entre le jour d'inoculation et le 3^{ème} jour, comprend une phase exponentielle (de 0 au 1^{er} jour), une phase de ralentissement (du 1^{er} au 2^{ème} jour), et une phase stationnaire (du 2^{ème} au 3^{ème} jour). La seconde période débute au 3^{ème} jour et se caractérise par une phase exponentielle (du 3^{ème} au 4^{ème} jour), une phase de ralentissement (du 4^{ème} au 5^{ème} jour) et une phase de déclin (du 5^{ème} au 8^{ème} jour). Entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour, nous observons soit une légère reprise de croissance (milieu Bennett), soit une stabilisation. Au cours de cette croissance, il y a une basification progressive du milieu et le pH atteint en fin de fermentation la valeur de 8,4. Le mycélium se présente sous forme de pelotes de couleur orange brunâtre et de dimension variable, le plus souvent entre 3 et 5 mm de diamètre. Le filtrat de culture est de couleur jaune pâle les 3 premiers jours de fermentation et vire progressivement entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour au jaune-orangé. Cette couleur est due à un pigment sécrété qui s'est avéré, suite à notre étude, doté d'une activité antibiotique.

Simultanément, les activités antifongiques et antibactériennes apparaissent dès le premier jour d'incubation. L'activité antifongique est équivalente pour les deux milieux, mais elle diffère entre *F. o. lini* et *M. ramannianus*. Elle présente trois maxima aux 2^{ème}, 5^{ème} et 9^{ème} jours contre *F. o. lini* et deux maxima aux 4-5^{èmes} et 8-9^{èmes} jours contre *M. ramannianus* (celui du 2^{ème} jour étant apparemment masqué). Ceci atteste de la production de plusieurs composés actifs différents. L'activité antibactérienne contre *B. subtilis* est meilleure sur le milieu Bennett que ISP2 et elle est maximale les 3-4^{èmes} et 8-9^{èmes} jours d'incubation.

Il est intéressant de souligner que la production maximale des antibiotiques a lieu durant les phases de ralentissement de croissance pour *F.o. lini*, ou de ralentissement et stationnaire pour *M. ramannianus* et *B. subtilis*. Pour les trois microorganismes, une autre production maximale est notée durant la phase additive de croissance (8-9^{èmes} jours) (appelée encore croissance cryptique) qui fait suite à la phase de déclin.

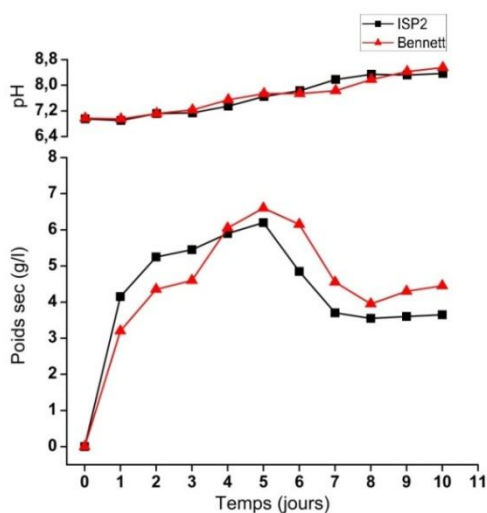


Figure 17 : Cinétiques de croissance et de pH de la souche AA1 dans les milieux ISP2 et Bennett.

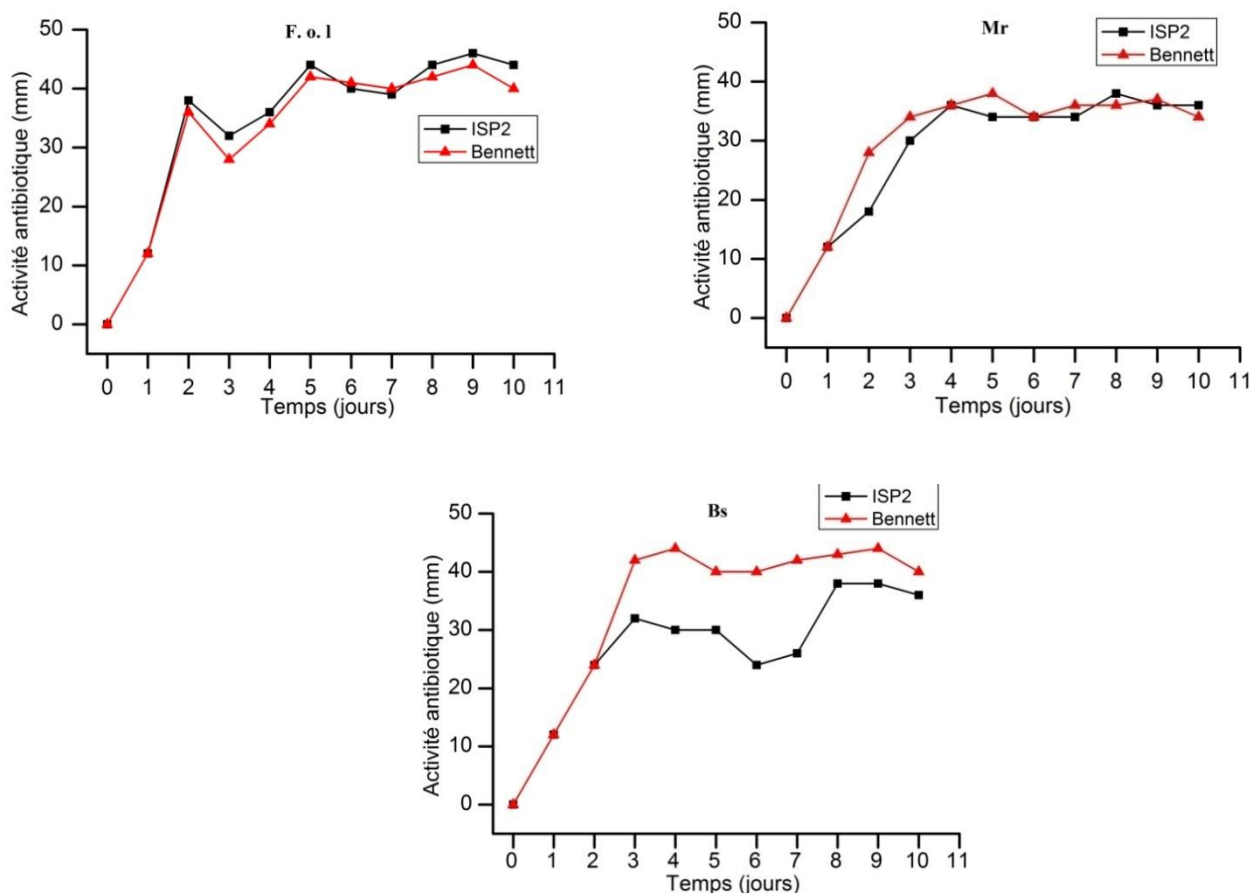


Figure 18 : Cinétiques de l'activité antibiotique contre *Mucor ramannianus* (Mr), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (F.o.1) et *Bacillus subtilis* (Bs) de la souche AA1 dans les milieux ISP2 et Bennett.



Fusarium oxysporum f. sp.
lini
(au 5^{ème} jour d'incubation)

Mucor ramannianus
(au 9^{ème} jour d'incubation)

Bacillus subtilis
(au 9^{ème} jour d'incubation)

Figure 19 : Activité antibiotique de la souche AA1 (méthode des puits) contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, *Mucor ramannianus* et *Bacillus subtilis*.

Note. Bn = Bennett.

2.- Discussion et conclusion

La souche AA1 possède de fortes potentialités inhibitrices avec un spectre large touchant les champignons, les levures et les bactéries. Elle est remarquable par son activité qui est la plus forte contre tous les germes cibles. Cette activité s'étend sur plusieurs champignons d'intérêt agronomique, comme *Botrytis cinerea* et plusieurs *Fusaria* qui sont phytopathogènes, ainsi que des contaminants des denrées alimentaires comme les *Aspergilli* dont plusieurs sont impliqués dans la production de toxines. L'activité s'étend également sur les levures et même sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Les cinétiques de croissance et de production des antibiotiques ont été menées en conditions liquides en agitation sur deux milieux complexes, l'ISP2 et le Bennett, qui ont déjà été utilisés pour ce genre d'étude dans notre laboratoire et sont connus pour être favorables à la production d'antibiotiques (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007). Les deux milieux, par leur richesse en nutriments, se sont montrés favorables et équivalents entre eux pour la croissance et la production des antibiotiques par les souches étudiées. Le pH évolue, dans tous les cas, de la même manière et avec une vitesse constante pour atteindre des valeurs légèrement basiques (entre 8 et 9). Cette évolution serait due à la dégradation de sources azotées organiques tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure, qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier induit la basification du milieu. De telles constatations ont été énoncées par Strub (2008) pour expliquer l'augmentation du pH par l'apparition des ions ammonium dans la culture de *Saccharothrix algeriensis* lors de la croissance et de la synthèse des antibiotiques.

Chapitre III – Résultats et discussions

Les cinétiques de croissance des cinq souches ne présentent pas de phase de latence. Cette phase est connue pour correspondre au temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture. Elle est observée surtout lorsque l'inoculation est réalisée avec des spores ou des précultures âgées ou préparées dans des conditions différentes. L'absence de cette phase est donc 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 (précultures fraîches de un à deux jours de croissance).

Chez la souche AA1, la courbe de croissance se caractérise par le phénomène de diauxie avec une présence de deux phases exponentielles. Ce phénomène est généralement observé dans les milieux comportant deux sources de carbone osidique, le glucose et le lactose ou galactose ou xylose (Monod, 1942; Prescott *et al.*, 2002; Euzéby, 2013). Cependant, il peut également se manifester, parfois dans des cultures avec une seule source osidique et une source azotée. C'est le cas par exemple de *Saccharothrix algeriensis* qui présente une première phase de croissance en utilisant les acides aminés du milieu de culture comme source de carbone et d'azote avec une très faible consommation du glucose comme source d'énergie. Après une petite phase stationnaire, la croissance reprend (une seconde phase exponentielle) en utilisant cette fois-ci le glucose comme source de carbone et d'énergie (Strub, 2008). Il se pourrait que le phénomène de diauxie observé pour la souche AA1 soit dû aussi à la consommation précoce des acides aminés de l'extrait de levure ajouter au milieu et que le glucose ne soit consommé en tant que source de carbone qu'au cours de la seconde phase exponentielle.

Pour notre actinomycète, nous observons après la phase de déclin (du 8^{ème} au 10^{ème} jour) une croissance additive (assez faible), appelée communément croissance cryptique, laquelle a été déjà signalée chez plusieurs microorganismes, notamment les entérobactéries (Prescott *et al.*, 2002). Cette croissance cryptique s'explique par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin. Le début de la croissance bactérienne est accompagné par l'initiation de la production des antibiotiques. En général, la production des 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 même en phase exponentielle (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

Pour la souche AA1, les productions maximales d'antibiotiques ont lieu durant les phases de ralentissement et stationnaire, comme dans le cas de la majorité des microorganismes. Il en est de même pour *Saccharothrix algeriensis* qui produit ses composés durant les deux phases stationnaires de la croissance diauxique (Strub, 2008). Une autre production maximale d'antibiotiques pour la souche AA1 a lieu en fin de phase de déclin pour atteindre un maximum

Chapitre III – Résultats et discussions

durant la croissance cryptique. Ce phénomène n'a pas été signalé à notre croissance chez les actinomycètes.

Les courbes de suivi des activités (surtout antifongique dans notre cas), présentent deux à trois maxima. Ceci atteste donc de la production de plusieurs antibiotiques ou complexes d'antibiotiques qui seraient soit des dérivés proches, comme c'est souvent le cas, soit des groupes d'antibiotiques différents. Dans le cas de la souche AA1, un décalage dans les temps de productions maximales et dans le nombre de maxima est observé lors du suivi de l'activité antifongique contre *M. ramannianus* et *F. o. lini*, mais aussi dans le cas de l'activité antibactérienne contre *B. subtilis*. Ceci suggère la production de plusieurs antibiotiques à spectres d'activité différents. Les mêmes constatations sont valables pour les souches D5, D22, D54 et B31.

III.- EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE AA1

1.- Production, extraction, détection et purification des antibiotiques de l'isolat AA1

Un schéma du protocole général suivi est illustré par la figure 20 et ce, pour mieux présenter les différentes étapes d'extraction, de détection, de purification et de caractérisation des antibiotiques de la souche AA1.

1.1.- Production des molécules actives de l'isolat AA1 en fioles d'Erlenmeyer

La production des antibiotiques en grande quantité a été réalisée sur le milieu ISP2 qui favorise plus la production d'un pigment soluble jaune, lequel s'est avéré être un antifongique très intéressant par son activité assez puissante.

La souche AA1 a ainsi été cultivée pendant 8 jours dans un shaker (30°C; 250 rpm).

1.2.- Extraction des antibiotiques

1.2.1.- Extraction à partir du mycélium

L'extraction des antibiotiques à partir de 50 g de mycélium humide et égoutté a été réalisée par 60 mL de méthanol. L'extrait a une couleur orange foncée comme la couleur initiale du mycélium et présente une bonne activité contre les champignons filamenteux *M. ramannianus* (28 mm) et *F. o. lini* (30 mm), et aussi contre *Bacillus subtilis* (36 mm).

1.2.2.- Extraction des activités à partir du filtrat de culture et tests d'antibiographie

Pour l'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture de la souche AA1, 4 solvants organiques de polarités différentes ont été testés: *n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol. Les résultats des antibiographies des extraits, illustrés par les figures 21 et 22, montrent que le *n*-butanol est le meilleur du point de vue extractibilité.

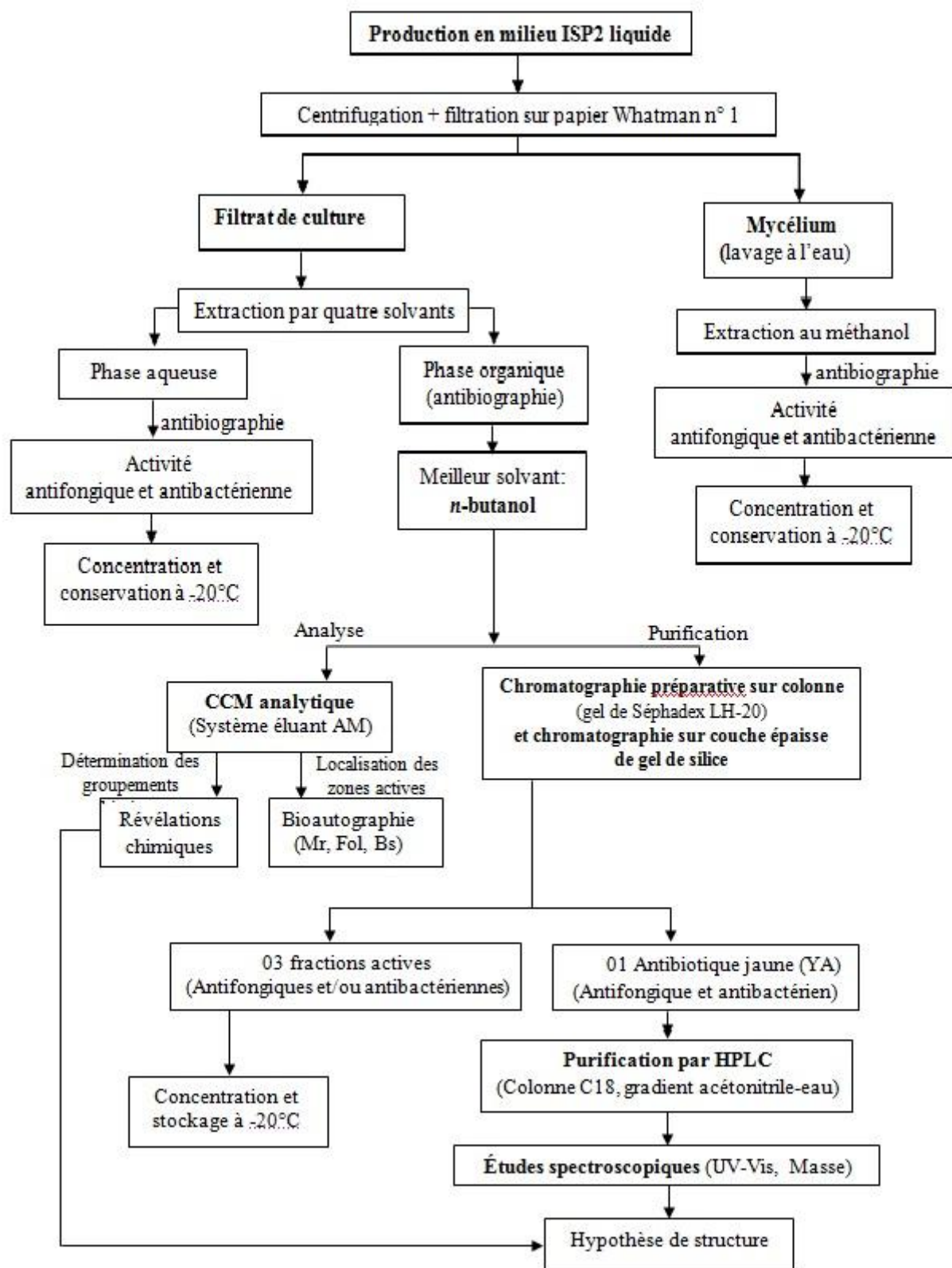


Figure 20 : Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques de l'isolat AA1.

Note. Mr = *Mucor ramannianus*; Fol = *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*; Bs = *Bacillus subtilis*.
AM = système de solvants "Acétate d'éthyle-méthanol" (100:15 v/v).

Chapitre III – Résultats et discussions

Du point de vue qualitatif (résultats vérifiés par bioautographie et non illustrés), les mêmes taches actives sont obtenues dans tous les cas sauf pour le *n*-hexane qui n'extrait qu'une fraction antibactérienne uniquement et qui est apolaire et différente des autres composés actifs.

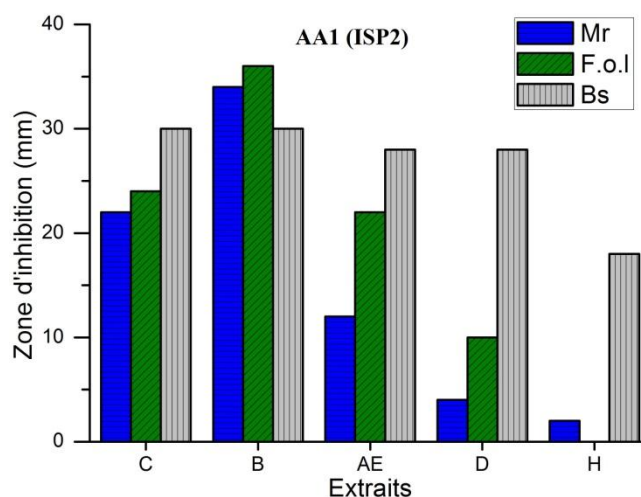


Figure 21 : Activité antimicrobienne des extraits organiques du filtrat de culture de l'isolat AA1 en milieu ISP2.

Note. H, *n*-hexane; D, dichlorométhane; AE, acétate d'éthyle; B., *n*-butanol; C., extrait méthanolique du mycélium. Le diamètre des disques (6 mm) n'est pas compris dans les zones d'inhibition.

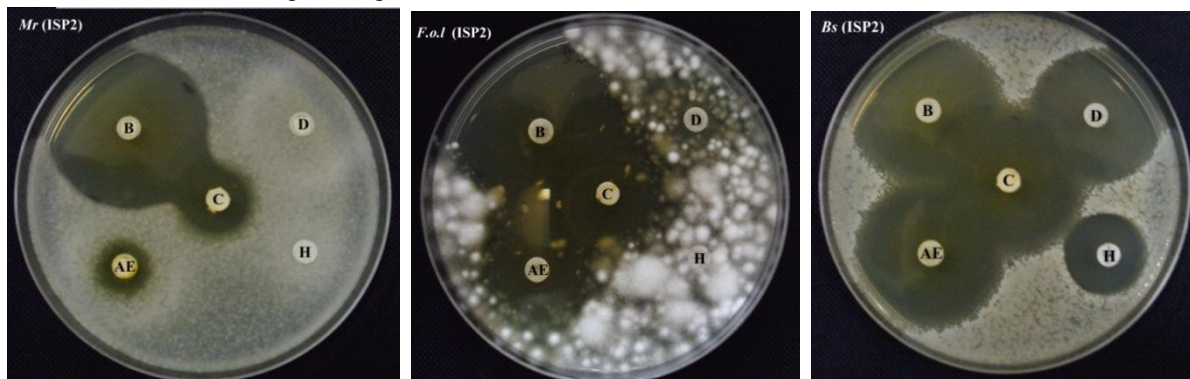


Figure 22 : Révélation par antibiographie des activités antibiotiques des extraits organiques du filtrat de culture de l'isolat AA1.

Note. H, *n*-hexane; D, dichlorométhane; AE, acétate d'éthyle; B., *n*-butanol; C., extrait méthanolique du mycélium.

L'activité résiduelle de la phase aqueuse obtenue après extraction au *n*-butanol a été vérifiée par la méthode de diffusion des puits et s'est avérée contenir encore une activité antifongique et antibactérienne.

2.- Discussion et conclusion

Les produits actifs antifongiques et antibactériens des filtrats de culture des cinq souches d'actinomycètes sont en fait partiellement extractibles par les solvants moyennement ou peu polaires que nous avons utilisés. En effet, une fraction active reste toujours dans le filtrat même après extraction. Il se pourrait que l'extraction n'ait pas été complète (et il faudrait re-extraire plusieurs fois) ou qu'il existe un (ou des) antibiotique (s) polaire (s) non extractible (s) par ces solvants et qu'il s'agira de déterminer dans le futur.

Parmi les quatre solvants testés, le *n*-butanol, qui est connu pour son pouvoir élevé d'extraction, a donné les meilleurs résultats. Il permet d'extraire de façon plus efficace une plus grande quantité d'antibiotiques mais il extrait aussi plus d'impuretés non actives qui risquent de gêner les purifications suivantes, comme l'ont d'ailleurs constaté Zitouni (2005), Badji (2006) et Boudjella (2007). Pour cela, avant de procéder à la purification finale par HPLC, il serait nécessaire d'effectuer des semi-purifications par chromatographie sur colonne et/ou sur couche épaisse de gel de silice.

L'extrait butanolique de la souche AA1 est de couleur jaune orangé, laquelle caractérise cette souche. Cette couleur est due à un pigment sécrété dans le filtrat de culture. La présence de produits colorés, surtout s'ils s'avèrent actifs, sont appréciés puisque aisément détectables et donc généralement facilement purifiables. Ils peuvent également aider le suivi et la purification des autres composés actifs incolores en jouant le rôle de repère dans les procédés de purification.

L'activité, que ce soit antifongique ou antibactérienne, est retrouvée également dans les mycéliums des cinq souches et serait soit de même nature que celle sécrétée dans le filtrat de culture, soit de nature différente. Des analyses plus avancées vont apporter des éléments de réponse. Les extraits mycéliens ont été conservés à - 30°C pour une étude ultérieure.

III.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE AA1

1.- Détection des antibiotiques

1.1.- Détection des polyènes par spectroscopie UV-visible

L'analyse UV-visible de l'extrait butanolique brut est effectuée pour savoir si cet extrait contient ou pas des antibiotiques polyéniques. Le spectre (figure 23) présente trois pics caractéristiques des polyènes à 291, 305 et 319 nm, et plus particulièrement ceux du groupe des tétraènes. Ceci indique la présence d'antibiotique (s) de ce groupe dans le filtrat de culture de la souche AA1.

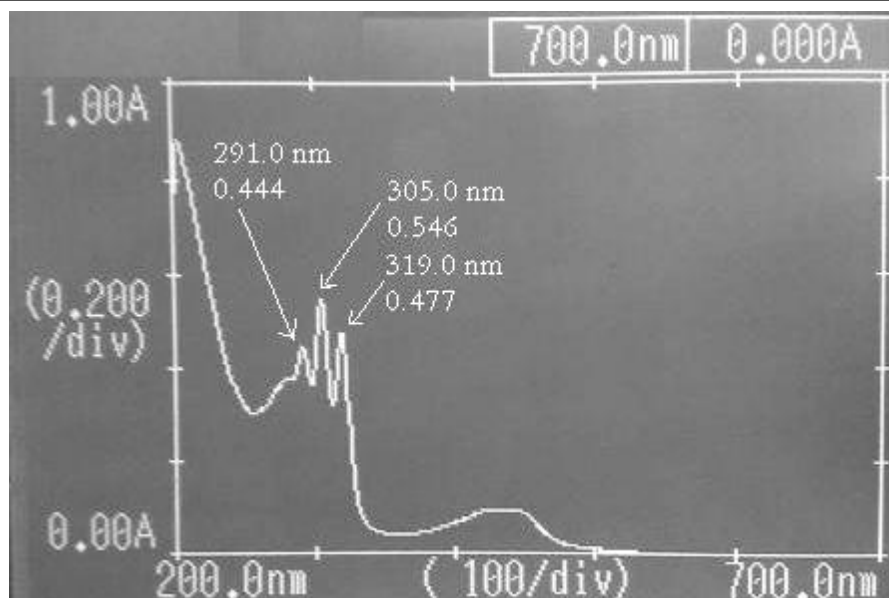


Figure 23 : Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'extrait butanolique brut de la souche AA1 cultivée en milieu ISP2.

1.2.- Détection des antibiotiques par bioautographie

1.2.1.- Chromatographie analytique sur couche mince

Deux systèmes de solvants de migration, AM (acétate d'éthyle-méthanol, 100 /15) et BAE (*n*-butanol-acide acétique-eau, 3/1 /1, en volumes), ont été testés pour l'élution de l'extrait butanolique. Le système AM a été retenu pour les bioautographies, les révélations chimiques et les purifications car il permet une meilleure séparation des taches qui sont localisées sous UV et à l'œil nu, comparativement au BAE.

1.2.2.- Révélations microbiologiques: bioautographies

Après migration sur le système AM de l'extrait butanolique, les plaques de CCM ont fait l'objet d'une bioautographie contre *M. ramannianus*, *F. o. lini* et également *B. subtilis*. La figure 24 illustre les résultats des bioautographies des extraits butanoliques des jours d'incubation 2, 5 et 9.

Chapitre III – Résultats et discussions

aromatiques polycycliques). Les tests sont par contre négatifs pour le FeCl_3 , (révélateur des phénols et des acides hydroxamiques) et le naphtorésorcinol (révélateur des glucides). Ceci suppose la présence d'un antibiotique aromatique polycyclique aminé.

La tache A2 n'est révélée que par le naphtorésorcinol, la vanilline- H_2SO_4 et le formaldéhyde- H_2SO_4 , ce qui suggère une structure aromatique polycyclique glycosylée.

La réaction positive de la tache A3 avec le naphtorésorcinol et la vanilline- H_2SO_4 (et négative pour les autres), suggère la présence de glucides et d'alcools supérieurs et l'absence d'aromatique et d'amine.

2.- Purification de l'antibiotique YA

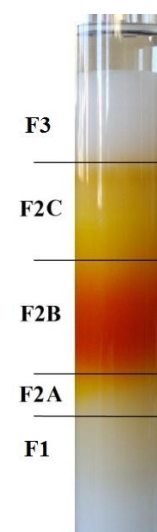
En raison de sa très forte activité antifongique (comparativement aux autres antibiotiques), les travaux se sont poursuivis uniquement sur YA.

2.1.- Semi-purification

L'extrait butanolique brut concentré de couleur jaune-orangé de la souche AA1 est repris dans du méthanol et semi-purifié par chromatographie sur colonne de gel séphadex LH-20 en mode isocratique (75% de méthanol-eau). Six fractions sont récoltées (Tableau 12) en fonction de leurs couleurs et leur temps d'élution puis testées par antibiographie. Les tests d'antibiographies ont révélé trois bandes principales très actives et distinctes par leurs couleurs: F2A (jaune clair), F2B (jaune orangé vif) et F2C (jaune clair).

Tableau 12. Fractions obtenues par chromatographie sur colonne de gel séphadex LH-20.

Fraction	Couleur	Temps d'élution (en mn)*	<i>F. o. lini</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
F1	Non colorée (volume mort)	48	0	0
F2A	Jaune clair	53	18	20
F2B	Jaune-orangé vif	62	26	30
F2C	Jaune clair	71	22	26
F3	Jaune pâle	83	10	0
F4	Brun pâle (fin de l'élution)	89	0	10



* Temps d'élution pour un débit de 1,2 mL/min de la phase d'élution méthanol 75%-eau 25%.

Pour la suite du travail, seule la bande jaune intense F2B, la plus active et correspondant à la tache YA, a fait l'objet de purification par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice.

Chapitre III – Résultats et discussions

Sur les plaques, la fraction F2B a montré une bande jaune sans aucun contaminant visible à l'œil nu et aux UV. Cette bande a été désorbée au méthanol pour être purifiée par HPLC.

2.2.- Purification finale de l'antibiotique YA par HPLC

Après semi-purification du produit YA, les injections effectuées en HPLC ont montré que celui-ci est totalement pur puisque son profil ne comporte qu'un seul pic actif (figure 25). De ce fait et pour la suite du travail, l'antibiotique YA a été purifié par passage sur colonne de séphadex et par CCM, et sa pureté vérifiée par HPLC.

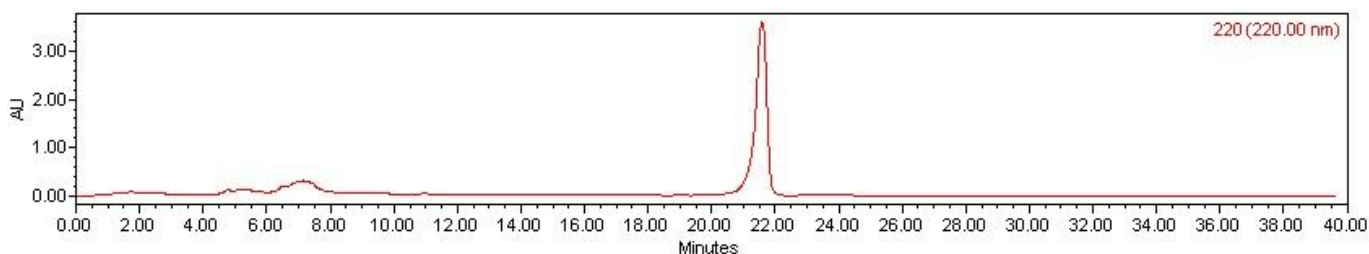


Figure 25 : Profil d'élution en HPLC de la première injection de YA purifié précédemment par séphadex LH-20 et par CCM.

Une première injection du composé YA (RF = 0.7 en acétate d'éthyle-méthanol, 100-15v/v) résultant de chromatographie sur couche épaisse; système de gradient linéaire continu, acétonitrile 50-100% dans l'eau; taux de débit, 1 mL min⁻¹; détection, 220 nm.

3.- Caractérisation spectroscopique de l'antibiotique YA

3.1.- Spectroscopie UV-visible

Le spectre UV-visible de l'antibiotique YA pur n'a pas montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes (figure 26). Le polyène, identifié précédemment à un tétraène serait donc dans une autre fraction active. L'antibiotique YA absorbe à 202, 242 et 445 nm. L'absorption entre 400 et 500 nm est assignée à la présence d'un chromophore responsable de la couleur jaune de cet antibiotique suggérant la présence d'un noyau hétérocyclique avec des doubles liaisons conjuguées, déjà révélé par le réactif de Dragendorff.

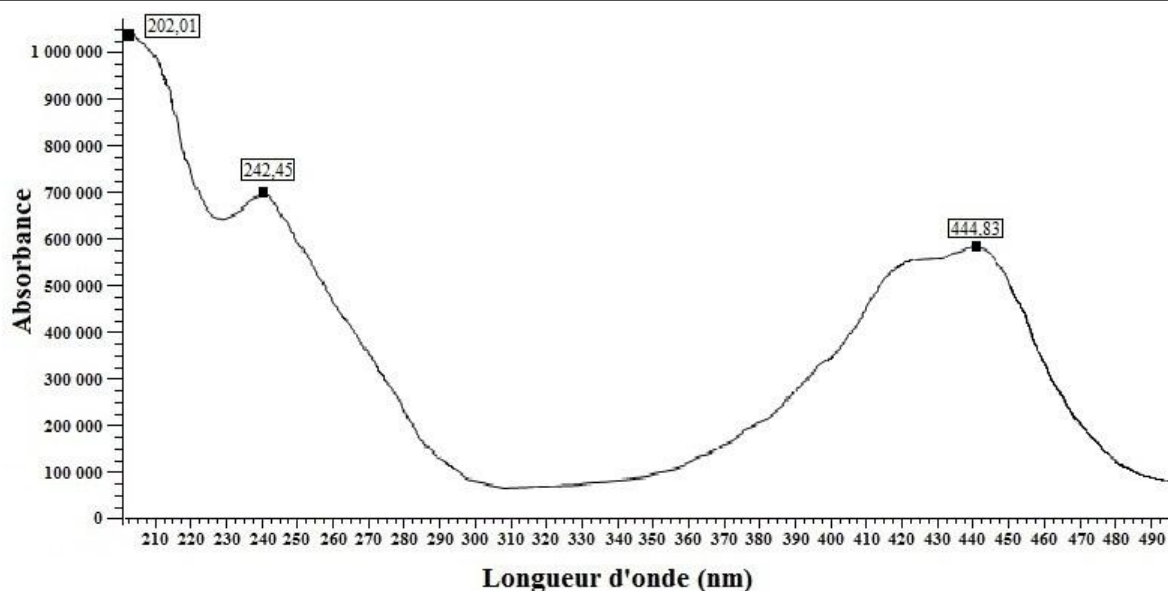


Figure 26 : Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique YA de la souche AA1.

3.2.- Spectroscopie de masse

Le spectre de masse réalisé par nano-ESI-MS "nano-electrospray ionisation masse spectrometry" en mode négatif illustré dans la figure 27, montre un ion pseudomoléculaire $M-H^+$ à 1253. L'antibiotique YA possède donc une masse moléculaire $M = 1254$.

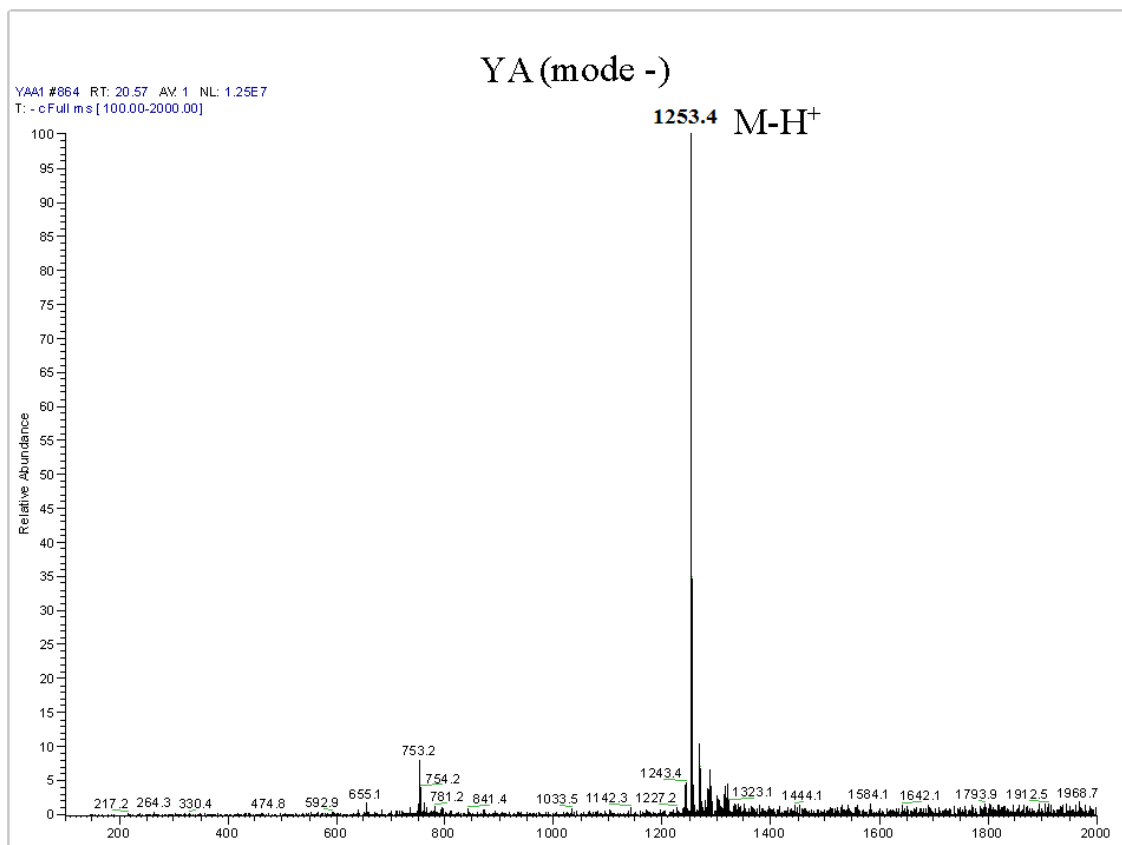


Figure 27 : Spectre de masse obtenu par Nano-ESI-MS de l'antibiotique YA.

4.- Etude de la stabilité de l'activité antifongique de YA

Les résultats de l'effet du pH, de la température et de la lumière sur l'activité antifongique de l'antibiotique YA sur *F. o. lini* sont présentés dans la figure 28.

4.1.- Effet du pH

L'activité antifongique est maximale à pH neutre et n'est que très peu affectée par les traitements de l'antibiotique à des pH variant entre 5 et 10; cependant elle chute sensiblement à pH 3 et 4, et surtout 11 et 12.

4.2.- Effet de la température

Les tests sont réalisés à pH 7. Nous remarquons que même si son activité est affectée partiellement par la hausse de la température, l'antibiotique YA montre une certaine résistance à ce facteur et sa structure n'est pas entièrement détruite. En effet, comparativement au témoin conservé au froid, cet antibiotique garde malgré tout environ 50% de son activité, même après des traitements à 100°C durant 15 min ou après 10 min d'autoclavage à 120°C. On enregistre une diminution partielle d'environ 20 à 30% après un traitement de 60 min à 50°C et 30 min à 70°C. Par contre, l'activité se conserve totalement à 4°C et -20°C, pour des durées allant jusqu'à six mois (données non illustrées).

4.3.- Effet de la lumière

L'exposition pendant 24 h à la lumière du jour ou d'une lampe de 100 Watts (type Néon), induit une faible baisse (13 à 23%) de l'activité antifongique en comparaison avec la conservation à l'obscurité. L'activité antifongique est donc peu sensible aux courtes expositions à la lumière.

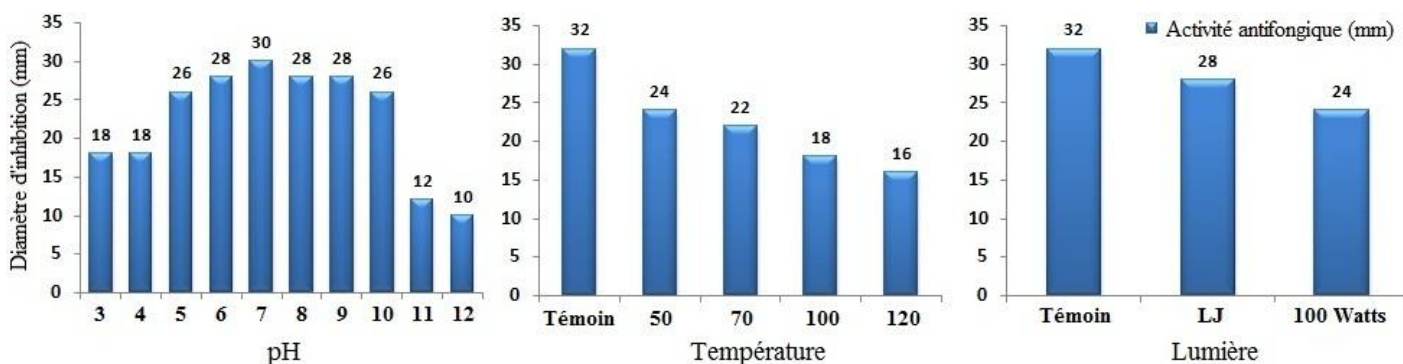


Figure 28 : Effet des facteurs physico-chimiques sur l'activité antifongique de l'antibiotique YA.

Note. Température: témoin (n'ayant pas subi de traitement thermique); 50°C (pendant 60 min); 70°C (pendant 30 min); 100°C (pendant 15 min); 120°C (pendant 10 min à l'autoclave). Lumière: témoin (à l'obscurité); LJ, Lumière du jour.

5.-Discussion et conclusion

La souche AA1 sécrète plusieurs antibiotiques extraits par le *n*-butanol qui s'est révélé être le meilleur solvant d'extraction. L'analyse chromatographique sur couche mince a montré que le système d'élution AM (Acétate d'éthyle-méthanol, 100:15 v/v) permet une meilleure séparation des taches. Ce système éluant semble être adéquat pour la séparation de molécules moyennement polaires; il a donné de bonnes séparations dans plusieurs autres cas dans notre laboratoire (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006). La bioautographie de la phase butanolique a montré la présence de quatre taches actives dont deux nommées YA et A1, sont antifongiques et antibactériennes à la fois et les deux autres sont antifongique pour A3 et antibactérienne pour A2. L'analyse et le suivi par bioautographie des extraits butanoliques des jours d'incubation 2, 5 et 9 montre que les fractions actives YA, A1 et A2 sont synthétisées dès les premiers jours de fermentation alors que la fraction antifongique A3 n'est produite que tardivement. L'analyse UV-visible de l'extrait butanolique brut indique la présence d'une (ou des) molécule (s) de nature polyénique (Martin, 1979; Dinya et Sztaricskai, 1986). Les polyènes sont généralement connus pour leur toxicité et leur instabilité et ont été éliminés des programmes de recherche de nouveaux antifongiques. Selon les longueurs d'ondes d'absorption dans l'UV, cet (ces) antibiotique (s) est (sont) de type tétraène qui est un groupe très connu de polyènes. Les travaux dans notre laboratoire ont montré que ce type de molécules ne migre que très peu ou pas dans le système de solvants AM et de ce fait il est très probable que la tache A1 correspondrait à cet antibiotique. Cependant, au vu du profil de A1 qui est en plus antibactérien (activité non retrouvée chez les polyènes qui sont strictement antifongiques), il est fort probable que cette tache soit un mélange de polyènes (s) et d'antibiotique (s) antibactérien (s). Il est à exclure que la tache A3 (antifongique uniquement) soit le polyène, car son Rf est élevé (0,85) et son action est sélective (contre *M. ramannianus* mais pas contre *F. o. lini*), contrairement aux polyènes. La souche AA1 sécrète donc au minimum cinq antibiotiques (YA, A2, A3 et deux dans A1) mais il est très probable que ce nombre soit plus élevé, vu que la fraction A2 se présente sous forme de longue trainée active suggérant la présence de plusieurs antibiotiques antibactériens.

Les révélations chimiques ont montré que la fraction A1 contient, outre le tétraène, des composés aromatiques polycycliques aminés. La fraction A2 est de nature aromatique polycyclique glycosylé et la fraction A3, de nature osidique (sans aromatiques polycycliques, ni amines).

Ces différentes natures chimiques des antibiotiques ont également été mises en évidence dans notre laboratoire chez plusieurs genres d'actinomycètes autres que *Streptomyces* (Zitouni, 1995; Nekhili, 1996; Bouti, 1997; Boudjella, 2007; etc.).

Chapitre III – Résultats et discussions

L'actinomycine D possède le même spectre d'action (antibactérien et antifongique) que l'antibiotique YA; mais elle est connue surtout pour sa puissante activité anticancéreuse. Elle possède une forte toxicité envers les cellules animales, due à sa forte affinité avec les acides nucléiques (ADN et ARN). Elle a tout d'abord été utilisée pour le traitement des tumeurs malignes, mais son utilisation a cessé en raison de sa toxicité élevée (Asselineau et Zalta, 1973). Plusieurs actinomycines sont connues dans le monde; elles sont de couleur jaune, orange à rouge et font l'objet de plusieurs recherches, notamment dans le domaine médical (Asselineau et Zalta, 1973; Scriban 1999).

Avant de passer à l'étape des essais sur les plantes pour la lutte contre les agents phytopathogènes, nous avons étudié l'effet du pH, de la température et de la lumière sur l'activité de YA afin de nous prévenir contre d'éventuels traitements pouvant mener à la perte des activités de l'antibiotique car de nombreuses molécules d'origine biologique sont sensibles à ces facteurs (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992; Scriban, 1999). Ainsi, nous avons remarqué que l'antibiotique YA est relativement stable aux variations de pH (entre 5 et 10) et après six mois de conservation à 4°C, -20°C et à température ambiante. Cependant, il présente une stabilité moindre aux températures élevées, à une exposition prolongée à la lumière et surtout, aux pH acides (3 et 4) et basiques (11 et 12). Les seules précautions que nous avons prises au cours et après les purifications sont de ne pas laisser nos cultures exposées trop longtemps à la lumière et d'éviter les hautes températures (supérieures à 50°C). Il faut souligner que l'actinomycine D présente la même stabilité que l'antibiotique YA.

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de rechercher, à partir des sols sahariens, des actinomycètes producteurs d'antifongiques. Nous avons abouti à la mise en évidence de la richesse de ces sols en genres répandus dans le monde comme *Streptomyces* ou peu fréquents tels que *Saccharothrix*, *Nocardiosis*, etc., et aussi, à la découverte de nouvelles espèces et la description de plusieurs nouvelles molécules bioactives.

Le présent travail rentre dans cette optique et a comme objectif la recherche d'actinomycètes dans les sols sahariens et la mise en évidence de nouvelles espèces, ainsi que l'étude du potentiel effectif et génomique des souches à produire des molécules bioactives.

Notre étude a été réalisée sur 14 échantillons de sols, provenant de trois régions sahariennes (Djelfa, Boussaâda et Ain Amine). L'isolement des actinomycètes sur les milieux "chitine vitamines B a permis d'obtenir 85 isolats sur le milieu utilisé.

Près de 91,70% des isolats présentent les caractéristiques morphologiques des *Streptomyces* et 8,3% celles de divers autres genres.

Les 85 isolats d'actinomycètes ont subi un screening préliminaire sur milieu solide ISP2 afin de rechercher leur pouvoir antifongique contre des champignons. Il est intéressant de souligner que l'ajout de la rifampicine et de la pénicilline a permis de sélectionner cinq isolats présentant les activités les plus fortes: AA1 D5, D54, D22 (les isolats les plus puissants, sélectionnés par la rifampicine), B31 (l'isolat le plus puissant, sélectionné par la pénicilline). L'ajout d'antibiotiques au milieu Ch-VB a souvent permis, dans le passé, dans notre laboratoire, de sélectionner des souches d'actinomycètes appartenant à de nouvelles espèces et produisant de nouveaux antibiotiques.

La caractérisation chimique basée sur la détermination de la forme isomérique de l'acide diaminopimélique, des sucres taxonomiquement importants, des phospholipides, des acides gras et des ménaquinones des isolats AA1, D5, D54, D22 et B31 ont permis de confirmer les résultats de l'identification morphologique et de les classer dans le genre *Streptomyces*.

Les isolats AA1, D5, D54 et D22 qui ont fait l'objet d'une étude phylogénétique basée sur le séquençage de l'ADNr 16S, ont été rapproché l'isolat AA1 à l'espèce *Streptomyces mutabilis* (99,93% de similarité), les isolats D5 et D22 à l'espèce *Streptomyces cyaneofuscatus* (99,86% et 99,79% de similarité respectivement) et l'isolat D54 à l'espèce *Streptomyces griseoplanus* (99,50% de similarité). Phénotypiquement (morphologie et physiologie), l'isolat AA1 est proche de l'espèce *S. mutabilis* à l'exception d'un pigment soluble jaune-orangé vif présent uniquement chez notre isolat. Malgré ces similitudes, AA1 ne peut pas être identifié de manière certaine à

cette espèce, vu qu'il existe chez les actinomycètes, y compris les *Streptomyces*, des cas d'espèces bien distinctes entre elles mais présentant malgré tout 100% de similarité dans le séquençage de leur ADNr 16S. Seule une hybridation ADN-ADN permettra de savoir si AA1 est bien *Streptomyces mutabilis* ou une nouvelle espèce.

Le spectre d'action de l'isolat AA1 (à activité puissante) est très large, touchant tous les microorganismes testés, à savoir, plusieurs champignons phytopathogènes, mais aussi des champignons toxigènes pour l'homme, des levures et des bactéries (à Gram positif et à Gram négatif).

Les actinomycètes sont justement connus dans le monde pour produire assez souvent plusieurs antibiotiques par souche, La production d'antibiotiques de la souche AA1 a été effectuée sur le milieu ISP2 à 30°C et en condition d'agitation permanente pendant 5 jours. Les antibiotiques sécrétés dans le milieu de culture ont été extraits par le *n*-butanol uniquement, mais qui extrait en même temps une petite quantité de sels présents dans le milieu de production, lesquels sont très gênants pour la purification des molécules actives.

La révélation microbiologique par bioautographie des extraits butanoliques de souche AA1 à activité antibactérienne intéressante, a montré la présence de 2 zones à activité antifongique et antibactérienne à la fois (antibiotiques notés YA et A1), ou antifongique (noté A3), ou encore antibactérienne (noté A2). Un polyène (tétraène), qui pourrait être contenu dans la fraction A1, a été mis en évidence par spectroscopie UV-visible. Les révélations chimiques ont montré que YA est de nature hétérocyclique (type alcaloïde), tandis que les autres contiennent des sucres (A3), des aromatiques polycycliques glycosylés (A2) ou des aromatiques polycycliques aminés (A1). Plusieurs antibiotiques de même nature ont été obtenus auparavant dans notre laboratoire.

L'antibiotique YA (le plus puissant des quatre) a été purifié sur colonne de séphadex LH-20, sur couche épaisse de gel de silice et par HPLC (colonne C18). Il a montré une certaine stabilité au pH, à la température et à la lumière. Son spectre UV-visible a été déterminé (maxima à 202, 242, et 445 nm), ainsi que de masse ($M = 1254$).

Ces caractéristiques ainsi que sa couleur et son spectre d'action le font rapprocher fortement de l'actinomycine D, antibiotique connu pour sa puissante activité anticancéreuse, mais dont la toxicité relativement élevée pour l'homme a empêché son utilisation thérapeutique. Il serait nécessaire d'effectuer à l'avenir une analyse portant sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13 pour déterminer la structure de l'antibiotique YA.

Les perspectives qui découlent de ce travail sont nombreuses et multiples.

- Du point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'effectuer une hybridation ADN-ADN entre les souches et *Streptomyces* spp. Les plus proches pour savoir si nos souches appartiennent à ces espèces ou à des nouvelles espèces. De même, le séquençage de l'ADNr 16S et une hybridation ADN-ADN permettront l'identification des souches B31 parmi les espèces existantes de *Streptomyces*.
- Pour Les souches D5, D54, D22 et B31, il serait intéressant d'étudier leurs antibiotiques (bioautographies, révélations chimiques, études spectroscopiques, déterminations des CMI, etc.), d'autant plus que ces souches ont montré une forte activité, mais dirigée surtout contre certains champignons.
- Pour la souche AA1, outre l'antibiotique YA, il serait judicieux d'étudier également les antibiotiques A1 et A3 (antifongique et antibactérien/antifongique) et même A2 (antibactérien), de manière à connaître tout d'abord leur spectre d'action et si celui-ci s'avère intéressant, de déterminer alors leur structure chimique. Ceci permettra aussi de déterminer de manière certaine lequel de ces antibiotiques est le tétraène.
- Enfin, en ce qui concerne l'antibiotique YA, le travail le plus urgent à réaliser est de déterminer sa structure chimique en effectuant les analyses RMN, car si cet antibiotique s'avère être l'actinomycine D dont les propriétés bioactives sont connues, il faudrait en tenir compte dans les travaux futurs. L'antibiotique YA a l'avantage d'être facile à purifier (sans passer par HPLC) et est sécrété en quantité appréciable. Cependant, il serait nécessaire d'optimiser sa production s'il s'avère être d'un grand intérêt.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Asselineau J. et Zalta J.P. (1973). - Les antibiotiques. Structures et exemples de mode d'action. Herman Ed., Paris.
- Atika M. (2012). -Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycetes halophiles des sols sahariens et mise en evidence de nouvelles especes d'actinopolyspora. Thèse de Doctorat, E.N.S. de kouba, alger.2p.
- Badji B. (2006). - Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.
- 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.
- Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2006). - Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp., AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, **52**: 373-382.
- Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou Kh. and Beaulieu C. (2002). - Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. Microb. Biot.*, **17**, 49-54
- Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou Kh. and Beaulieu C. (2002). - Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. Microb. Biot.*, **17**, 49-54
- 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.
- Becking J.H. (1974). - Family III. *Frankiaceae*. In: Bergey Manual of Determinative Bacteriology. 8th Eds. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.
- Berdy J. (2005). - Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, **58** (1), 1-26.

- 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.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2004). - Vol. 4. Garrity G.M., Bell J.A and Lilburn T.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 401.
- Betina V. (1973). - Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatogr.*, **78**, 41-51.
- 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. 177 p.
- Boudjella H. (2007). - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique El-Harrach. 188p.
- Bouti K. (1997). - Les genres rares *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora* et *Streptosporangium* (*Actinomycetales*) dans les sols sahariens; taxonomie numérique et étude de quelques uns de leurs antibiotiques. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. Alger. 149 p.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. et 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.
- Bryskier A. (1999). - Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses (Eds.). Paris.
- Buckingham J. (1997). - Dictionary of natural products. Chapman and Hall/CRC, England CRC Press.
- Bycroft B. W. (1988). - Dictionary of antibiotics and related substances. London: Chapman and Hall, 944 p.
- Chan T. and Aszalos, A.(1987).- TIC and UV-light spectrometry. *In: modern analysis of antibiotic*, Aszalos A., (Eds.), Vol. **27**, Marcel Dekker Inc, New-York. p.1982.
- Collins M.D., Goodfellow M. and Minnikin D.E. (1980). - Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. *J. Gen.* .
- Cragg G.M., Newman D.J. and Snader K.M. (1997). - Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, **60**, 52-60.
- Davies J. and Mazel D. (1997). Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur*. **170**: 14-17.

- Decre D. et Courvalin P. (1997). - Intérêt des antibiotiques nouveaux. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **12**, 160-164.
- Dommergues Y. et Mangenot F. (1970). - Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris. Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé. 168p.
- Eder C., Kurz M. and Wink J. (2002). - Use of thiolutin dioxide and its derivatives for the treatment of CNS disorders and a process for the preparation thereof. *Eur. Pat. Appl.*, p.11.
- Ettlinger L., Corbaz R., and Httter R. (1958). - Zur Systematik der Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, **31**, 326-358.
- Euzéby J.P. (2013). - List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesa.html> France.
- 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. and Williams S.T. (1983). - Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.
- 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. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, pp. 1-6.*
- 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.
- Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990). - Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.
- Gupte M., Kulkarni P., and Ganguli B.N. (2002). - Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **58**, 46-57.
- Haslay C., Leclerc H. 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation. Lavoisier TEC & DOC.
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1984). - Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*, **65**, 501-509.
- Hegde V.R., Silver J., Patel M., Gullo V.P., Yarborough R., Huang E., Das P.R., Puar M. S., Di Domenico B. J. and Loebenberg D. (2001). - Novel fungal metabolites as cell wall active antifungals: fermentation, isolation, physico-chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiot.*, **54**, 74-83.

- Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (1994). - In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P. S., Teniola D., Addo P. (2002). - Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . *PCT Int. Appl.*, p. 19.
- Horinouchi S. 2002. Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Biosciences*. **7**: 2045-2057.
- Igarashi M., Kinoshita N., Ikeda T., Nakagawa E., Hamada M. and Takeuchi T. (1997). - Formamicin, a novel antifungal antibiotic produced by a strain of *Saccharothrix* sp. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J Antibiot.*, **50**, 926-931.
- Imada C. (2005). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. (*Antonie van Leeuwenhoek*). **87**: 59-63
- Kämpfer, P. (2006) The family Streptomycetaceae. Part I: taxonomy. In: Dworkon, M. (Ed.), The Prokaryotes, Springer, New York, pp. 538-604.
- Kase H., Iwahashi K. and Matsuda Y. (1986). - K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot.*, **39**, 1059-1065.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S & Chun J (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**:716-721.
- Kim Y. S. and Kawai A. (1998). - Studies on the antiviral mechanisms of protein kinase inhibitors K-252a and KT5926 against the replication of vesicular stomatitis virus. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, **21**(5), 498-505.
- Kroppenstedt R. M. (1992). - The genus *Nocardiopsis*. In: The Prokaryotes, Balows A. et al. (Eds.), pp. 1139-1156, Springer Verlag, Berlin.
- Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. and Goodfellow M. (1990). - Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **13**: 148-160.
- Labeda D.P. (1989). - Genus *Saccharothrix* Labeda et al. 1984. 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. 2599-2601.
- Labeda D.P., Testa R.T., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1984). - *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 426-431.

- Lahdenperä ML, Simon E and Uoti J. Mycostop - a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. In: Beemster ABR, Bollen GJ, Gerlagh M, Ruissen MA, Schippers B, Tempel A (eds) Biotic interactions and soil-borne disease. Amsterdam: Elsevier; 1991. p. 258-263.
- Lam K.S., Mattei J. and Forenza S. (2002). - Carbon catabolite regulation of rebeccamycin production in *Saccharothrix aerocolonigenes*. *J. Ind. Microbiol.*, **4**, 105-108.
- Lamari L. (2006). - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 186 p.
- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F. (2002). - New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **55**: 696-701.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989). - Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris, p. 481..
- Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J.J. (1992).- Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin editeurs, Paris.
- Lazzarini A, Cavaletti, Toppo G & Marinelli F (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*.78: 399-405.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970b). - A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: The *Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- Lechevalier M.P. (1981). - Ecological associations involving actinomycetes. In: *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**, 159-166.
- Lechevalier M.P. and Gerber N. (1970). - The identity of madurose with 3-0-methyl-D-galactose. *Carbohydr. Res.*, **13**, 451-454.
- 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.) G. Fisher Verlag, Jena, 311-316.
- Lechevalier M.P., De bievre C. and Lechevalier H.A. (1977). - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**, 249-260.
- Loucif k. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de magister, Université Mentouri-Constantine.139p.
- Mariat F., Sebald M.1990. Actinomycétales..In:Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale.Medecine-Sciences.Flammation.France. Deuxième partie : 933-999.
- Mariat F., Sebald M.1990. Actinomycétales..In:Le Minor. L., Véron M. Bactériologie

- Martin J.F. and Liras P. (1989). - Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.*, **43**, 173-206.
- Merck E. (1975). – Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt. 149 p.
- Merrouche R. (2001) - 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, p 101.
- Minnikin D.E., Alshamaony L. and Goodfellow M. (1975). - Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J. Gen. Microbiol.*, **88**, 200-204.
- Misato T. (1982). - Present status and futur prospects of agricultural antibiotics. *J. pesticides Sci.*, **7**, 301-305.
- Monod, J. (1942). - Recherches sur la croissance des cultures bactérienne. Thèse PhD, université de Paris.
- Mordarska H., Mordarska M. and Goodfellow M. (1972). - Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **71**, 77-86.
- Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A.L.F., Lima Filho J.L. (2002). - Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18** (4), 307-312.
- 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.
- Murakata C., Matsuda Y. (1998). - Development of the bioprobe K-252a for treatment of neurodegenerative diseases. *Bio. Industry.*, **15** (7), 43-49.
- Nanjwad B., Chandrashehara S., Goudanavar P. S., Shamarez A. M., Manvi F. 2010. Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* **9**: 373-377.
- Nekhili H. (1996). - Classification numérique des genres *Actinoplanes*, *Couchioplanes* et *Micromonospora* (Actinomycetales) isolés des sols des zones arides algériennes. Purification et caractérisation partielle des principales molécules antifongiques synthétisées. Thèse de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.

- Nelson D. L. and Cox M. M. (2004) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th Edn, W. H. Freeman and Company, New York.
- Nonomura, H. (1974). - Key for classification and identification of 458 species of the Streptomycetes included in *ISP. J. Fement. Technol.*, **52** (2), 78-92.
- O'Donnel A. G., Minnikin D. E. and Goodfellow M., (1988). Integrated lipid and wall analysis of actinomycete. In "chemical methode in bacterial systematic" (Goodfellow M. and Minnikin D.E., coord) PP131-143, ac press., London.
- O'Hagan D. (1991). - The polyketide metabolites. Ellis Horwor (Eds.) New York, p. 176.
- 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.
- Ohmori K., Ishii H., Manabe H., Satoh H., Tamura T. and Kase H. (1988). - Anti-inflammatory and antiallergic effects of a novel metabolite of *Nocardiosis* sp. as a potent protein kinase C inhibitor from microbial origin. *Arzneimittelforschung.*, **38**, 809-814.
- Okami, Y. and Hotta, K. (1988). - Search and discovery of new antibiotics. In: M. Goodfellow, S.T. Williams & M. Mordarski (eds.) *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, New York, pp. 33-67.
- Peignen P. (1995). - A la recherche de nouveaux antibiotiques. *La recherche*, **26**, 444-447.
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gurtler, H. and Fiedler, H.P. (2000). - Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*, **80**, 135-142.
- Phoebe, C.H., Combie J., Albert F.G., Van Tran K., Cabrera J., Correia H. J., Guo Y., Lindermuth J., Rauert N., Galbraith W. and Selitrennikoff C. P. (2001). - Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *J. Antibiot.*, **54**, 56-65.
- Preobrazhenskaya T. P. and Ryabova I. D. In: Gauze, G. F., Preobrazhenskaia T. P., Kudrina E. C., Blinov N. O., Riabova I. D., and Sveshnikova M. A. (1986). - Problems of classification of actinomycetes-antagonists. *Government publishing house of medical literature, Medgiz, Moscow, USSR*, 391-398.
- Prescott LM., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M. et Dusart J., (2002). - *Microbiologie*. De Boeck Université. 1147p.
- Pridham TG, Hesseltine CW & Benedict RG (1958) A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl Microbiol* **6**(1):52-79.

- 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.
- Richert K., Brambilla E. and Stackebrandt E. (2005). - Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order *Actinomycetales*. *Journal of Microbiological Methods*, **60**(1) 115-123
- Roussion P. (1996). - la medecine face à ses limites. *Sciences et vie*, **946**, 154-161.
- 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., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et 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.
- Scriban R. (1999). - Biotechnologie. 5ème édition. Tec et Doc. (Ed.), Paris, 1042p.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D., 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species description from the first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **18**, 69–189.
- Singh S. and Barrett J. F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery-Fondation in natural products. *Biochem. Pharmacol.*, **71**: 1006-1015.
- Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat, Spécialité Génie de Procédés et Environnement, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).251p.
- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey N (1997) Proposal for a new hierarchical classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**:479-491.
- Stackebrandt E. and Goebel B.M. (1994). - Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 846-849.
- 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 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 Woese C.R. (1983). - The evolution of prokaryotes. Symposia of the Society for General Microbiology, 32, 1-31.
- Stackebrandt E. Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *j. Syst.Bacteriol.* **47**, 479-491.
- Stackebrandt E., Wunner-Fiissl B., Fowler V.J. and Schleifer K.H. (1981). - Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among sporeforming members of the order *Actinomycetales*. *Int. J. System. Bacteriol.*, **31**, 420-431.
- Steele D.B. and Stowers M.D. (1991). - Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annu Rev Microbiol.*, **45**, 89-106.
- Strub C. (2008). - Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.203p.
- Toumatia O, Compant S, Yekkour A, Goudjal Y, Mathieu F, Sabaou N and Zitouni A (2013) Biocontrol properties and colonisation ability of the phytosphere and the endosphere of wheat seedlings by *Streptomyces* sp. strain IA1 isolated from the soil in the sahara of Algeria. *Microbiol Res* (soumis).
- 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.
- Tresner, H.D., Davies M.C. and Backus E.J. (1961). - Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.*, **81**, 70-80.
- Umezawa H. (1988). - Low molecular-weight enzyme inhibitors and immunodifiers. *In: Actinomycetes in biotechnology*. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M (Eds.). London: Academic Press, p. 285-325.
- Vinig L.C., (1985) - Antibiotic biosynthesis. *Biotechnol. Adv.*, **3**, 171-194.
- Von Dohren H. and Grafe U. (1997). - General aspect of secondary metabolism. *In: Rehm H.J., Reed G (Eds.) Biotechnology: products of secondary metabolism, Vol. 7, 2nd Eds.* VCH /Wiley, Weinheim, pp. 2-55.
- Wagman G.H. and Weinstein M.J. (1980). -Antibiotics from *Micromonospora*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**, 537-557.

- 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.
- Yamaguchi T. (1965). – Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **89**, 444-453.
- Zitouni A. (2005). - Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 230 p.
- Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004). - Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, **57**, 367-372.

ANNEXES

ANNEXE 1

MILIEUX DE CULTURE

I.- MILIEUX D'ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES

* Milieu "chitine - vitamines B " (Hayakawa et Nonomura, 1987)

Chitine: 2 g; K_2HPO_4 : 0,35 g; KH_2PO_4 : 0,15 g; $MgSO_4, 7H_2O$: 0,2 g; NaCl: 0,3 g, $CaCO_3$: 0,02 g; $FeSO_4, 7H_2O$: 10 mg; $ZnSO_4, 7H_2O$: 1 mg; $MnCl_2, 4H_2O$: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

Pour ce milieu, sont ajoutés:

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

* Une solution stérile d'un antifongique, le cycloheximide (80 mg/L).

II.- MILIEUX D'IDENTIFICATION DES 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: $FeSO_4, 7H_2O$: 0,1 g; $MnCl_2, 4H_2O$: 0,1 g; $ZnSO_4, 7H_2O$: 0,1 g; eau distillée q.s.p. 100 mL.

1.3.- Milieu ISP4

Amidon: 10 g; K_2HPO_4 : 1 g; $MgSO_4, 7H_2O$: 1 g; NaCl: 1 g; $(NH_4)_2SO_4$: 2 g; $CaCO_3$: 2 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

1.4.- Gélose nutritive:

Peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,5.

2.- Etude physiologique

2.1.- Dégradation des glucides et dérivés

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

La croissance des souches en fonction des sources de carbone est estimée sur milieu ISP9 de Pridham et Gottlieb (1948). Ce milieu est subdivisé en trois parties:

Solution A: composée de sources de carbone (10g/L dans l'eau distillée) stérilisées par ultrafiltration.

Solution B: solution saline dont les constituants seront utilisés à l'état de trace dans le milieu final. Elle est composée de: sulfate de cuivre: 0,64 g; sulfate ferreux: 0,11 g; chlorure de manganèse: 0,79g; sulfate de zinc: 0,15g; eau distillée 100 mL.

Cette solution est conservée au réfrigérateur.

Solution C: milieu minéral de base. Il est composé de: sulfate d'ammonium: 2,64 g; phosphate monopotassique: 2,38 g; phosphate bipotassique: 5,65g; sulfate de magnésium: 1 g; solution B: 1 mL; eau distillée q.s.p. 1000 mL; pH 7,5.

L'agar est ajouté au milieu qui est ensuite stérilisé à l'autoclave. Le milieu final est obtenu en mélangeant aseptiquement 100 mL de solution A et 900 mL de solution C. 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.- Dégradation de l'adénine, de la guanine, de la tyrosine, et de la xanthine (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.

2.3.- 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.

2.4.- 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.

2.5.- 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.

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 à 7,2.

2.- Milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955)

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.

IV.- MILIEU POUR *FUSARIUM* ET *BOTRYTIS* (PURIFICATION ET PRODUCTION D'INOCULUM).

*** Milieu PDA (Rapilly, 1969)**

Filtrat de pomme de terre: 500 mL; glucose: 20 g; agar: 20 g; eau distillée: 500 mL. pH 6,5.

. Le filtrat est préparé en mettant à bouillir 200 à 250 g de pomme de terre épluchée dans 500 ml d'eau distillée.

ANNEXE 2

REVELATEURS CHIMIQUES UTILISES POUR LES ANTIBIOTIQUES (Merck, 1975)

1.- 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.

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

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

3.- 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.).

4.- Ninhydrine: révélateur des amines, des acides aminés, des osamines et des phospholipides contenant la phosphatidyléthanolamine.

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

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

5.- 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).

6.- Réactif de Dragendorff: selon Munier et Macheboeuf: utilisé pour révéler la phosphatidylcholine.

Solution a: dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth basique dans 10 mL d'acide acétique cristallisable et 40 mL d'eau.

Solution b: dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 20 mL d'eau.

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

Solution de vaporisation: avant emploi, mélanger 1 mL de solution de réserve, 2 mL d'acide acétique cristallisable et 10 mL d'eau.

Les taches de phosphatidylcholine apparaissent orange-jaune.