

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



## Mémoire de fin d'étude

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en  
SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

OPTION  
MICROBIOLOGIE-BACTERIOLOGIE

PAR  
FRIK Rami

Thème

ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES  
DES SOUCHES *Planomonospora* sp. CCF ET  
*Saccharothrix* sp. MB29 CONTRE DIVERS  
GERMES

Soutenu le 18 /09/2017

Devant le jury composé de:

M <sup>me</sup> HAMAI F.	M.C.A USDB 1	Présidente
M <sup>me</sup> BOUDJEMAA N.	M.A.A USDB 1	Examinatrice
M <sup>me</sup> MEKLAT A.	M.C.A USDB 1	Promotrice
M <sup>me</sup> CHAABANE CHAOUCHE F.	M.A.B E.N.S KOUBA	Co-promotrice

Année universitaire 2016- 2017

## **Remerciements**

Ce master a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM).de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba.

Je tiens en premier lieu à remercier le directeur du laboratoire, Monsieur SABAOU Nassereddine, de m'avoir accueilli dans son Laboratoire.

Merci à notre encadrante, Madame MEKLAT Atika, notre main lucrative pour ses aides, sa disponibilité et pour avoir mis à ma disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce thème.

Je m'adresse à notre co-promotrice, Madame CHAABANE CHAUCHE Fouzia à lui remercier pour son immense disponibilité, son dynamisme, son écoute, sa gentillesse et qui m'a aidé du début jusqu'à la fin.

Mes remerciements s'adressent également à BOUZNADA Khaoula pour son aide et ses conseils pour les CMI.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à toute l'équipe de l'ENSAT de Toulouse pour les analyses de la masse.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury :

Mme HAMAIIDI qui a bien voulu être présidente

Mme BOUDJEMAA pour avoir accepté de juger ce travail.

A tous les membres du laboratoire LBSM, pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques et leur sympathie.

Enfin, notre profonde reconnaissance à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers grands parents, Hamid, et TRABELSI Khatima.

Pour leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour. Que Dieu vos procure une bonne santé et une longue vie.

A mes parents, Aliouette et BOUDJEMAA Samira

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

A ma fiancée Imène, merci pour ton soutien, ton encouragement et tes conseils.

À toutes mes tantes Chahinez, Naima et Sara

A mes chers et adorable frère et sœurs, Mohamed, Rania et Leila.

A tous mes cousins et mes cousines.

A mon ami OUALI Abdkrim, qui est toujours fidèle.

A mes camarades de classe EZZEROUG Chaima, Sarra BENMOUMOU et IFTENE Ferial, je n'oublierai jamais votre aide.

À toute personne ayant contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

# Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

<b>Introduction.....</b>	1
<b>Revue bibliographique.....</b>	3
1. Définition des actinobactéries.....	3
2. Ecologie des actinobactéries.....	3
3. Importance des actinobactérie.....	4
3.1.Importance dans le domaine médical.....	4
3.2.Importance dans le domaine agronomique.....	4
3.3.Importance dans le domaine industriel.....	4
4. Antibiotiques.....	5
4.1.Définition des antibiotiques.....	5
4.2.Classification des antibiotiques.....	5
4.2.1. Bêta-lactamines.....	5
4.2.2. Aminosides ou aminoglycosides.....	6
4.2.3. Tétracyclines.....	7
4.2.4. Macrolides.....	8
4.2.5. Phénicolés.....	9
4.2.6. Quinolones.....	10
4.3.Résistance aux antibiotiques.....	11
4.4.Méthodes de recherche de nouveaux antibiotiques.....	11
4.4.1. Recherche par voie naturelle.....	12
4.4.2. Recherche par voie chimique.....	13
5. <i>Planomonospora</i> .....	13
5.1.Taxonomie.....	13
5.2.Antibiotiques secrétés.....	14
6. <i>Saccharothrix</i> .....	14
6.1.Taxonomie.....	15
6.2.Antibiotiques secrétés.....	15
<b>Matériel et méthodes.....</b>	17
<b>I. Matériel.....</b>	17
1. Souches d'actinobactéries.....	17
2. Souches des germes cibles.....	17
<b>II. Méthodes.....</b>	18
1. Criblage de l'activité antagoniste des actinobactéries par la méthode des stries croisées.....	18
2. Cinétique de l'activité antibiotique.....	18
2.1.Cinétique de la souche CCF.....	18
2.1.1. Pré-culture.....	18
2.1.2. culture.....	18
2.2.Cinétique de la souche MB29.....	19

3. Production, extraction et purification des molécules bioactives.....	19
3.1.Production des molécules bioactives.....	19
3.1.1. Production des molécules bioactives pour la souche CCF.....	19
3.1.2. Production des molécules bioactives par la souche MB29.....	19
3.2.Extraction des molécules bioactives.....	19
3.2.1. Extraction des molécules bioactives produites par la souche CCF.....	20
3.2.2. Extraction des molécules bioactives produites par la souche MB29.....	20
3.2.3. Antibiographie.....	20
3.3.Purification des biomolécules.....	21
3.3.1. Appareillage.....	21
3.3.2. Conditions expérimentales.....	21
4. Antibiographie des fractions purifiées.....	22
5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de molécules bioactives de la souche MB29.....	22
6. Caractérisation partielle des molécules bioactives.....	22
6.1.Spectroscopie UV-visible.....	22
6.2.Spectrométrie de masse.....	23
<b>Résultats et discussions.....</b>	<b>24</b>
1. Mise en évidence de l'activité antagoniste des deux souches d'actinobactéries.....	24
1.1.Résultats.....	24
1.2.Discussion.....	25
2. Suivi de l'activité antibiotique des souches étudiées.....	26
2.1.Résultats.....	26
2.1.1. La souche CCF.....	26
2.1.2. La souche MB29.....	27
2.2.Discussion.....	28
3. Extraction et purification des molécules bioactives des souches CCF et MB29.....	29
3.1.Extraction des composés actifs et antibiographie.....	29
3.2.Purification des molécules bioactives par HPLC et antibiographie.....	30
4. CMI des fractions actives de la souche MB29.....	32
5. Caractérisation partielle du produit A5.....	33
5.1.Spectroscopie UV-visible.....	34
5.2.Spectrométrie de masse.....	35
6. Discussion.....	35
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>38</b>
<b>Références bibliographique</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des figures

	<b>Page</b>
<b>Figure 1 :</b> Structures de deux antibiotiques appartenant à la famille des beta-lactamines	7
<b>Figure 2 :</b> Structures de certains antibiotiques appartenant aux aminoglycosides.....	7
<b>Figure 3 :</b> Structure d'une tétracycline.....	8
<b>Figure 4 :</b> Structure d'un macrolide.....	9
<b>Figure 5 :</b> Structure des phénicolés.....	10
<b>Figure 6 :</b> Structure générale du quinolone.....	10
<b>Figure 7:</b> Cinétiques de l'activité antibactérienne de la souche CCF dans le milieu Bennett, contre <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline MRSA 639c et <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (MSSA). ....	27
<b>Figure 8 :</b> Cinétiques de l'activité antibactérienne et antifongique de la souche MB29 dans le milieu ISP2, contre <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c, <i>Candida albicans</i> M3 et <i>Aspergillus carbonarius</i> M333. ....	28
<b>Figure 9:</b> Activité antimicrobienne des extraits organiques des souches CCF et MB29.....	29
<b>Figure 10:</b> Profil d'éluion en HPLC (obtenus à 220 nm) de la première injection du produit de la souche CCF solubilisé auparavant dans le méthanol. ....	30
<b>Figure 11:</b> Profils d'éluion en HPLC (obtenus à 290 nm) de la première injection du produit de la souche MB29 solubilisé auparavant dans le méthanol. ....	31
<b>Figure 12:</b> Concentrations minimales inhibitrices de l'antibiotique A5 de la souche MB29.....	33
<b>Figure 13:</b> Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique A5 de la souche MB29.....	34
<b>Figure 14 :</b> Spectre de masse du produit A5 (Méthode Nano ESI en mode négatif) sécrété par <i>Saccharothrix</i> sp. MB29. ....	35

## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b>Tableau 1:</b> Les germes cibles utilisés dans différents tests.....	17
<b>Tableau 2:</b> Activité antagoniste des deux souches d'actinobactéries par la technique des stries croisées et des cylindres d'agar. ....	25
<b>Tableau 3:</b> Activités antibactériennes de la phase organiques de <i>Planomonospora</i> sp. CCF et <i>Saccharothrix</i> sp. MB29. ....	29
<b>Tableau 4:</b> Activités des fractions purifiées par HPLC du produit de la souche CCF solubilisé dans le méthanol. ....	32
<b>Tableau 5:</b> Activités des fractions purifiées par HPLC du produit de la souche MB29 solubilisé dans le méthanol. ....	32
<b>Tableau 6:</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques A1, A2, A3, A4 et A5 sécrétés par <i>Saccharothrix</i> sp. MB29. ....	34

## Liste des abréviations

Ac	<i>Aspergillus carbonarius</i>
Af	<i>Aspergillus flavus</i>
Ao	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Ap	<i>Aspergillus parasiticus</i>
ATB	Antibiotique
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
C	Cytosine
CMI	Concentrations Minimales Inhibitrices
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Fc	<i>Fusarium culmorum</i>
Fg	<i>Fusarium graminearum</i>
Foa	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>
Fp	<i>Fusarium proliferatum</i>
G	Guanine
HPLC	High performance liquid chromatography
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
MeOH	Méthanol
Ml	<i>Micrococcus luteus</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
rpm	Rotation Par Minute
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>



## Résumé

Ce travail porte sur l'étude de la production, l'extraction et la purification des molécules bioactives à partir de deux souches d'actinobactéries «*Planomonospora* sp. CCF et *Saccharothrix* sp. MB29».

L'évaluation de l'activité antagoniste de nos deux souches d'actinobactéries contre plusieurs germes cibles a montré que la souche CCF de *Planomonospora* est dotée d'une activité intéressante contre les bactéries à Gram positif uniquement, en particulier contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline, alors que la souche MB29 de *Saccharothrix* possède une forte activité contre les bactéries à Gram positif, les levures et les champignons filamenteux.

La cinétique de production d'antibiotiques des deux souches d'actinobactéries montre que l'activité antimicrobienne atteint son maximum à partir du 3<sup>ème</sup> jour pour la souche CCF et 5<sup>ème</sup> jour pour la souche MB29. La purification des extraits organiques des deux souches suivie par l'antibiogramme révèlent la présence de 4 composés bioactifs produits par la souche CCF et 5 produits par la souche MB29. Les concentrations minimales inhibitrices des cinq composés de la souche MB29 sont relativement moyennes à l'exception du composé désigné A5 qui inhibe la croissance des champignons et des levures cibles testés à une concentration de 2µg/ml seulement.

La caractérisation partielle du composé A5 a montré sa nature aromatique avec une masse de 670 Da.

**Mots clés:** Activité antagoniste, actinobactéries, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, antibiotiques, concentrations minimales inhibitrices.

## Abstract

This research study focuses on the production, extraction and purification of the bioactive molecules from two actinobacterial strains of "*Planomonospora* sp. CCF and *Saccharothrix* sp. MB29".

The screening of the antagonistic activity of the two actinobacterial strains against several target germs has shown that the CCF strain of *Planomonospora* had an interesting activity against only Gram-positive bacteria, in particular against meticillin resistant *Staphylococcus aureus*, while the MB29 strain of *Saccharothrix* had a strong activity against Gram-positive bacteria, yeasts and fungi.

The kinetics of antibiotics production of both strains showed that the antimicrobial activity reached its highest level from the third day for the CCF strain and the fifth day for the MB29 strain. The purification of the organic extracts of both strains followed by the antibiography revealed the presence of four bioactive compounds produced by the CCF strain and five bioactive compounds produced by the MB29 strain. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the five compounds produced by the MB29 strain were relatively average with the exception of the A5 compound which inhibited the growth of yeasts and fungi tested at only 2µg/ml.

The partial characterization of the A5 compound showed its aromatic nature with a mass of 670 Da.

**Key words :** Antagonistic activity, actinobacteria, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, antibiotics, minimum inhibitory concentrations.

## ملخص

يتناول هذا البحث دراسة إنتاج واستخلاص وتنقية الجزيئات النشطة بيولوجيا المنتجة من طرف سلالتين من الأكتينوبكتيريا "*Planomonospora* sp.CCF" و "*Saccharothrix* sp. MB29".

أظهر اختبار النشاط التضادي للسلالتين CCF و MB29 من الأكتينوبكتيريا ضد العديد من الجراثيم المستهدفة أن سلالة CCF من الجنس *Planomonospora* لديها نشاط جدو هام ضد البكتيريا الموجبة الجرام فقط، ولاسيما ضد *Staphylococcus aureus* المقاومة للميتيسيلين، في حين أن سلالة MB29 من الجنس *Saccharothrix* لديها نشاط قوي ضد البكتيريا الموجبة الجرام والخمائر والفطريات.

يظهر من خلال حركية إنتاج المضادات الحيوية لسلالتي الأكتينوبكتيريا أن النشاط المضاد للميكروبات يصل إلى أقصى حد له ابتداء من اليوم 3 فيما يخص السلالة CCF واليوم الخامس بالنسبة للسلالة MB29. تبين من خلال تنقية المستخلصات العضوية المنتجة من طرف السلالتين CCF و MB29 وكذا الكشف التضادي (*antibiographie*) وجود 4 مركبات نشطة بيولوجيا عند السلالة CCF و 5 عند السلالة MB29. التراكيز الدنيا المثبطة للمركبات الخمسة المنتجة من طرف السلالة MB29 هي متوسطة نسبيا باستثناء مركب A5 الذي يثبط نمو الفطريات والخمائر المستهدفة في تركيز 2 ميكروغرام / مل فقط.

وأظهر التشخيص الجزئي للمركب A5 طبيعته العطرية كما قدرت كتلته الجزيئية بـ 670Da.

**الكلمات المفتاحية :** النشاط التضادية، الأكتينوبكتيريا، *Saccharothrix*، *Planomonospora*، المضادات الحيوية، التراكيز الدنيا المثبطة.

# **Introduction**

## Introduction

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie. En effet, ils sont doués de plusieurs activités importantes et peuvent être considérés comme étant des agents performants pour lutter contre les maladies infectieuses.

L'évolution des microorganismes pathogènes a fait apparaître le phénomène de la résistance, de même que de mauvaises pratiques de prévention et de lutte contre l'infection (Grace Yim, 2011). La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement, elle entraîne une prolongation des hospitalisations, une augmentation des dépenses médicales et une hausse de la mortalité. D'autre part, les champs agricoles sont menacés par beaucoup de maladies, Ces deniers causent d'importantes pertes de rendement, sur les cultures fruitières et légumières.

Les actinobactéries sont les meilleurs candidats pour la production de ces molécules bioactives. Ce phylum bactérien regroupe des bactéries filamenteuses, de structure analogue à celle des champignons auxquels elles étaient autre fois assimilées. Mais malgré leur aspect morphologique de type fongique, leur physiologie et leur organisation cellulaire sont de type procaryote qui confirment leur classification parmi les bactéries (Bousseboua, 2002).

Le genre *Streptomyces* est à l'origine d'environ 70 % des molécules actives produites à l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques. Par conséquent, la surexploitation de ce genre comme étant une source de nouveaux agents antimicrobiens a conduit à une probabilité faible d'isoler de nouvelles molécules à partir de celui-ci au fil du temps (Solanki *et* Kahanna, 2008). De ce fait, plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces. Parmi les Ces stratégies, l'exploitation des souches appartenant à des genres rares (autres que le genre *Streptomyces*) et provenant d'écosystèmes extrêmes (Donadio *et al.*, 2002; Gupta, 2011). Pour s'adapter à ces environnements extrêmes (de température, de salinité, de pH, etc.), ces actinobactéries rares

disposent d'un système enzymatique et d'un métabolisme particulier leur permettant de produire des métabolites secondaires originaux dont les antibiotiques. En effet, cette fraction d'actinobactéries s'est révélée être une source potentielle d'antibiotiques et plusieurs nouvelles molécules ont été mises en évidence chez des genres rares tels que *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, *Planomonospora* et *Saccharothrix* (Genilloud *et al.*, 2011).

En Algérie, les sols sahariens, qui constituent un écosystème extrême, renferment un potentiel assez riche en actinobactéries, particulièrement celles rarement isolées de part le monde tels que les genres *Planomonospora*, *Planobispora*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*...etc, (Sabaou *et al.*, 1998) qui se sont révélés être de grands producteurs de nouvelles molécules antimicrobiennes (Zitouni *et al.*, 2005; Boudjella *et al.*, 2006 ; Boubetra *et al.*, 2013).

Dans le présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs l'évaluation de l'activité antagoniste, la cinétique de la production d'antibiotiques, l'extraction et la purification par l'HPLC des molécules bioactives produites par deux souches d'actinobactéries, ainsi que la détermination des concentrations minimales inhibitrices et la caractérisation partielle de la molécule la plus active.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique détaillée sur les actinobactéries en général, les antibiotiques et les genres *Planomonospora* et *Saccharothrix*.

La seconde partie du document est relative à la présentation du matériel et des méthodes utilisés.

Enfin la troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

# **Revue bibliographique**

## Revue bibliographique

### 1. Définition des actinobactéries

Les actinobactéries (précédemment appelées actinomycètes) sont des procaryotes, largement distribuées dans la nature et présentent une large gamme morphologique, allant des organismes unicellulaires, à des filaments de mycélium ramifiés. Beaucoup des actinobactéries ont un mode de vie mycélien et subissent une différenciation morphologique complexe (Dinech *et al.*, 2017). La définition récente des actinobactéries est celle donnée dans le manuel de Bergey de 2012 qui considère les actinobactéries comme des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en guanine plus cytosine (G+C) supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique, elles constituent le phylum des *Actinobacteria* qui comporte 6 classes, 16 ordres, 48 Familles et 291 genres.

### 2. Ecologie des actinobactéries

La plupart des actinobactéries sont saprophytes qui passent la majorité de leur cycle de vie en tant que spores. Cependant, ces microorganismes se sont adaptés à un large éventail d'environnement. On les rencontre dans la plupart des niches écologiques. La grande majorité est d'origine tellurique, en particulier dans les sols alcalins et les sols riches en matière organique, où ils constituent une partie importante de la population microbienne (Ait Barka *et al.*, 2015).

Les actinobactéries peuvent être trouvées dans les eaux douces, les eaux de mer, ainsi que dans l'air. En outre, elles ont un rôle écologique important dans la dégradation de la matière organique. Beaucoup d'actinobactéries ont évolué pour vivre en symbiose avec des plantes, des champignons, des insectes et des animaux. La plupart de ces interactions actinobactéries-hôte sont bénéfiques, les actinobactéries permettent à leur hôte de se protéger contre les agents pathogènes et les parasites (Anne Van Der *et al.*, 2017).

Les actinobactéries sont généralement chimio-organotrophes, hétérotrophes, mésophiles et neutrophiles, mais certains peuvent être acidophiles, alcaliphiles, psychrophiles, thermophiles, halophiles, halo-alcalophiles et même xérophiles (Meklat *et al.*, 2011).



### **3. Importance des actinobactéries**

Les actinobactéries possèdent un métabolisme secondaire important et produisent des molécules intéressantes en biotechnologie, médecine et l'agriculture (Ait Barka *et al.*, 2015).

#### **3.1. Importance dans le domaine médical**

Les actinobactéries produisent un nombre considérable de molécules bioactives qui sont impliquées dans divers effets biologiques. Ces bactéries produisent des composés antitumoraux, des substances vasodilatatrices, des anticholestérolémiques, des antihistaminiques, des vitamines, des antioxydants, des antiviraux et des antibiotiques, elles sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques (Demain, 2009; Rätty *et al.*, 2002; Takahashi et Omura, 2003; Solanki et kahana, 2008). En effet, plus de 45% des molécules bioactives d'origine microbienne sont produits par les actinomycètes (Solecka *et al.*, 2012). Parmi ces molécules, environ 80% sont produites par les espèces du genre *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Bull et Stach, 2005; Mohamed et Galal, 2005; Jose *et al.*, 2011). Les antibiotiques sécrétés par ce genre (plusieurs centaines) peuvent être à activités antibactériennes et/ou antifongiques ou encore, avoir des propriétés antitumorales et cytostatiques (Mann, 2001; Butler, 2004). Plusieurs d'entre eux ont trouvé une application thérapeutique assez importante (Jose et Jebakumar, 2013).

#### **3.2. Importance dans le domaine agronomique**

Les actinobactéries jouent divers rôles dans leurs associations avec divers organismes supérieurs, beaucoup d'entre eux ont évolué pour vivre en symbiose avec des plantes (Anne Van Der *et al.*, 2017). Ces microorganismes, qui y hébergent, produisent une large gamme de métabolites antagonistes qui contribuent dans la défense contre les phytopathogènes, et d'autres produits qui aident à dégrader la matière organique complexe, afin de la rendre assimilable par les plantes. Les actinobactéries du sol sont également connues pour leur capacité à améliorer la santé des plantes en stimulant leur croissance et leur développement grâce à la production de phytohormones (Scott *et al.*, 2017).

#### **3.3. Importance dans domaine industriel**

Les actinobactéries retiennent particulièrement l'attention des chercheurs, et semblent être d'excellentes candidates productrices de substances aux propriétés intéressantes. Ces bactéries jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières

organiques (lignine, cellulose...), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases. Il existe une réelle demande au niveau industriel pour des enzymes d'origine microbienne afin d'améliorer certains procédés de fabrication. Les domaines d'application enzymatiques sont très divers: industrie textile (décoloration de jeans), papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier), dépollution (attaque des substances phénoliques), industrie alimentaire (boulangerie).

### **4. Antibiotiques**

#### **4.1. Définition des antibiotiques**

Les antibiotiques sont toute substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui en solution à faible dose inhibent la croissance d'autres microorganismes ou les détruisent (Bugnicourt, 1995). Les antibiotiques peuvent agir sur la croissance des germes, interférer avec leur métabolisme énergétique ou inhiber la biosynthèse des composants cellulaires.

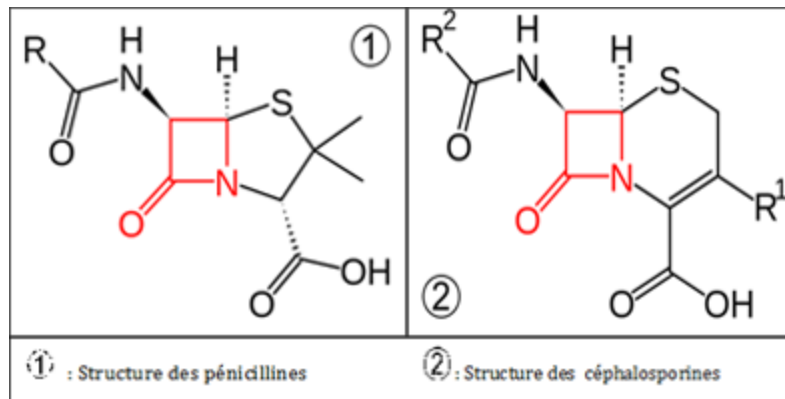
#### **4.2. Classification des antibiotiques**

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères qui sont l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Tout en adoptant la distinction selon la nature chimique, les antibiotiques ont été classés en grandes familles. La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupe assez homogènes, mais éloignés des objectifs cliniques. Cette classification fait apparaître 9 grandes familles et dont chacune comporte un certain nombre de sous-familles comprenant des antibiotiques chimiquement proches et parfois même dans leur spectre et leur mode d'action. Des données relatives à certaines familles sont données en ci-dessous.

##### **4.2.1. Bêta-lactamines**

L'ensemble des  $\beta$ -lactamines forme une large classe d'antibiotiques qui comprend les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Ces molécules contiennent toutes un noyau bêta-lactame dans leur structure moléculaire, et ce noyau bêta-lactame confère à la molécule son activité antibiotique.

Les  $\beta$ -lactamines possèdent un effet bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. Les cibles des bêta-lactamines sont les protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne (Tipper, 1985; Kohanski *et al.*, 2007).

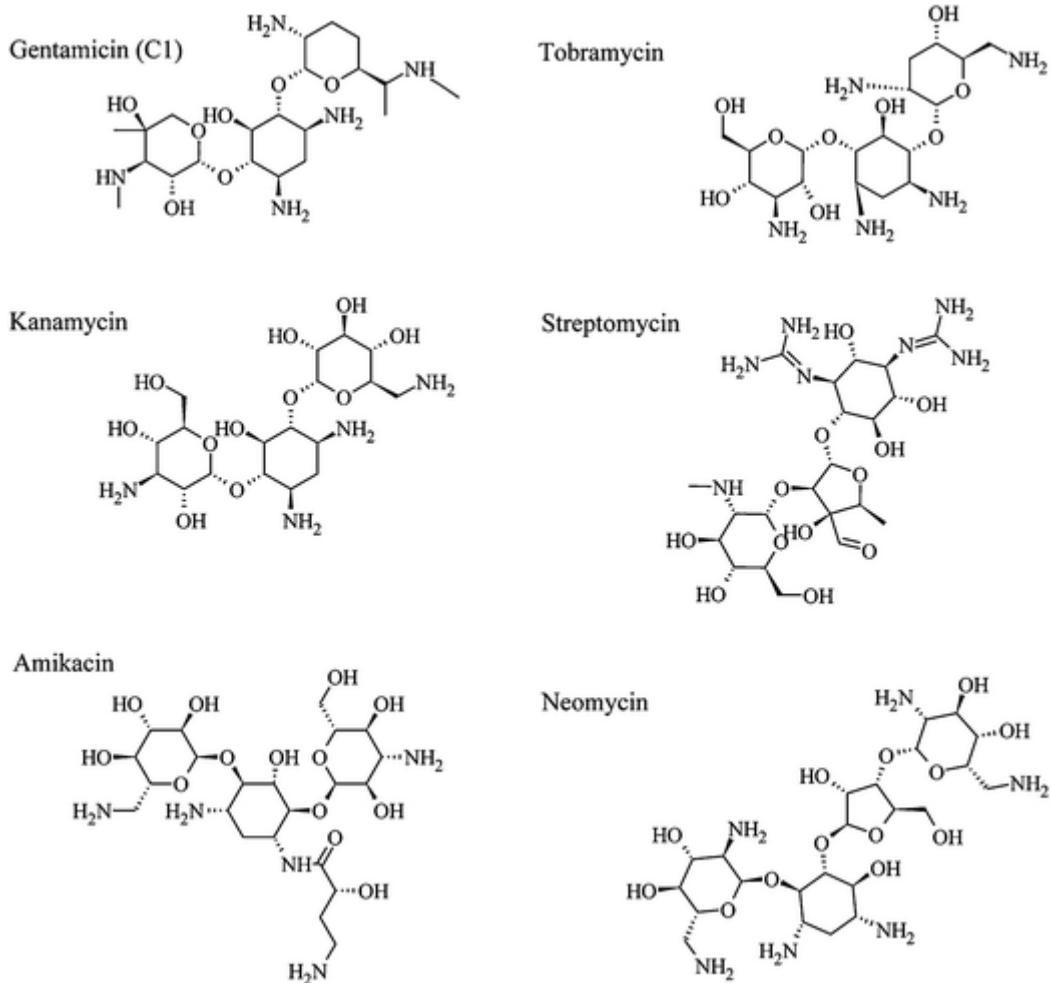


**Figure 1** : Structures de deux antibiotiques appartenant à la famille des beta-lactamines (Sohrab, 2005).

#### 4.2.2. Aminosides ou aminoglycosides

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémi-synthétiques (Yala *et al.*, 2001).

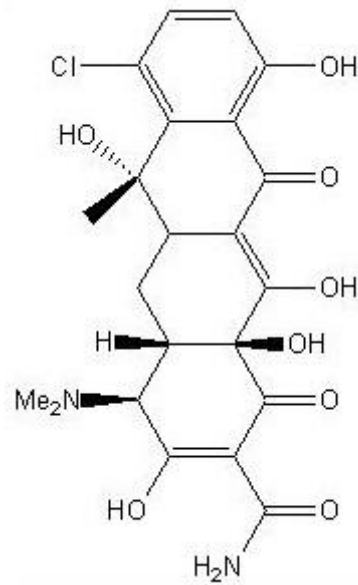
Les aminoglycosides sont des antibiotiques à large spectre typiquement bactéricides, et des molécules très hydrophiles de petite taille qui traversent la membrane cytoplasmique par un mécanisme nécessitant de l'énergie. Elles atteignent le cytoplasme et bloquent la synthèse des protéines en se fixant sur les sous-unités 30S du ribosome (Michael *et al.*, 2010).



**Figure 2 :** Structures de certains antibiotiques appartenant aux aminoglycosides (Karasawa et Steyger, 2011).

### 4.2.3. Tétracyclines

Les tétracyclines sont formées de 4 cycles carbonés accolés à l'origine de leur nom, Elles pénètrent par diffusion passive dans le cytoplasme pour se lier à la sous-unité 30S et bloquer la synthèse protéique en inhibant la liaison de l'ARNt-aminoacyle au ribosome. Ces molécules à spectre large ont un effet bactériostatique. Elle est active sur les cocci à Gram positif et les entérobactéries mais pas sur le bacille pyocyanique (Michael *et al.*, 2010).

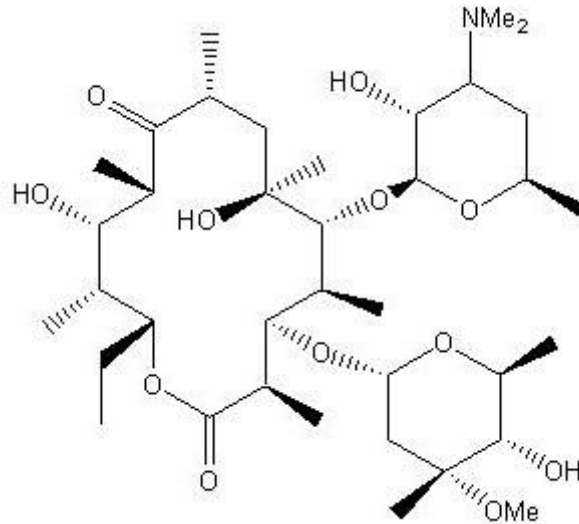


**Figure 3 :** Structure d'une tétracycline. (Demirdjian et Pontue, 2006).

#### 4.2.4. Macrolides

Les macrolides sont des molécules lipophiles qui possèdent un noyau lactone central qui est à la base de leur classification, selon le nombre d'atomes de carbone (Yala *et al.*, 2001).

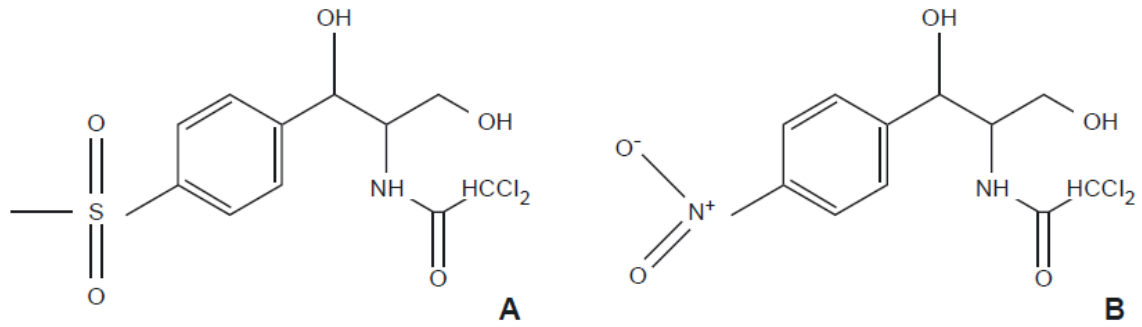
Ces molécules naturelles et hémisynthétiques sont groupées en raison de leurs mécanismes d'action et de leur spectre d'activité. Ces molécules pénètrent par diffusion dans le cytoplasme pour se fixer sur la sous-unité 50S du ribosome. Le blocage de l'élongation de la chaîne peptidique conduit à la formation de protéines incomplètes. Ces antibiotiques ont une activité bactériostatique (Michael *et al.*, 2010).



**Figure 4 :** Structure d'un macrolide. (Demirdjian et Pontue, 2006).

#### 4.2.5. Phénicolés

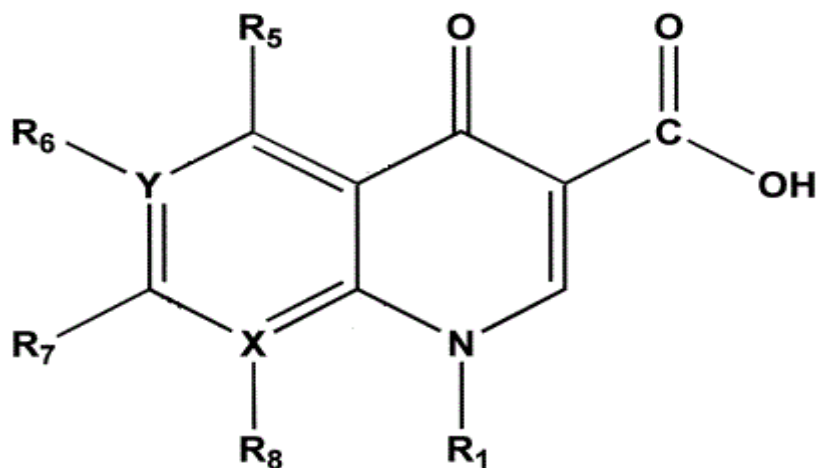
Les phénicolés sont des antibiotiques à large spectre. Actif sur la plupart des bactéries aérobies à Gram positif et négatif. Le chloramphénicol et le thiamphénicol, deux antibiotiques représentatifs de cette famille, sont deux molécules dont la structure est assez proche (Figure. 5). La chaîne centrale aminopropanediol est associée à l'activité antibactérienne de la molécule, le noyau aromatique pouvant être remplacé sans que cette activité soit supprimée. Cette structure confère une forte liposolubilité à ces molécules. Ils interfèrent avec la croissance bactérienne en inhibant la synthèse protéique par une action au niveau de la sous-unité 50S du ribosome. Ils se lient sur le site de fixation de l'acide ribonucléique (ARN) de transfert, stoppant l'élongation de la chaîne protéique au cours de la synthèse. Cette action est à l'origine d'un effet bactériostatique sur la plupart des germes sensibles, un effet bactéricide étant constaté avec certains pathogènes (Epaulard et Brion, 2009).



**Figure 5** : Structure des phénicolés (Rohr et Thiericke 1992). A : chloramphénicol, B : thiamphénicol

#### 4.2.6. Quinolones

Les quinolones ont une structure générale dérivant de l'acide dihydro 1,4 oxo 4 quinoleine carboxylique (Yala *et al.*, 2001). Elles pénètrent dans le cytoplasme par diffusion et atteignent deux cibles spécifiques, qui sont des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN génomique. Le complexe irréversible formé par l'enzyme, l'acide nucléique et l'antibiotique entraînent une inhibition rapide de la synthèse d'ADN suivi par la mort de la cellule. Ces antibiotiques sont donc bactéricides (Michael *et al.*, 2010).



**Figure 6** : Structure générale du quinolone. X et Y peuvent être des atomes de carbone ou d'azote, et les groupes R1, R5, R6, R7 et R8 peuvent être des structures très diverses (Gozalbes *et al.*, 2000).

### 4.3. Résistance aux antibiotiques

La découverte des antibiotiques à la fin des années 1940 a marqué une étape capitale dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces traitements ont permis d'épargner un grand nombre de vies et l'on a cru, un peu trop vite, que les maladies infectieuses seraient un jour toutes jugulées. En effet, cette introduction aurait dû provoquer une catastrophe chez les microbes, mais leur plasticité génétique leur a permis, non seulement de survivre, mais même de prospérer dans cet environnement hostile. Ainsi, on assiste de plus en plus au développement de souches microbiennes résistantes aux molécules bioactives. Plus la résistance est élevée, plus on prescrit de biomolécules et on favorise l'émergence de nouvelles résistances et la survenue d'infections incurables.

Les mécanismes de résistances aux différents antibiotiques ont été dans la plupart des cas élucidés. Pour chacune des classes d'antibiotiques, il existe au moins un mécanisme permettant à la bactérie résistante de se protéger. D'après Davies et Mazel (1994), les divers mécanismes de résistances aux antibiotiques (ATB) sont:

- Réduction de la perméabilité cellulaire aux ATB;
- Inhibition du transport actif des ATB ;
- Rejet des ATB hors de la cellule par efflux actif grâce à une pompe à protons ;
- Modification de la cible d'ATB ;
- Amplification de la cible de l'ATB ;
- Inactivation de l'ATB par des enzymes bactériennes ;
- Apparition d'une voie métabolique alternative.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est très complexe et peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. On peut citer par exemple, la résistance naturelle des entérobactéries et des *Pseudomonas* aux macrolides. La résistance acquise peut être soit par acquisition de gènes (résistance des Staphylocoques à la méticilline), soit par mutation chromosomique (résistance des *Citrobacter* aux céphalosporines).

### 4.4. Méthodes de recherche de nouveaux antibiotiques



De nouveaux agents antimicrobiens sont nécessaires pour lutter contre le nombre croissant de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques.

### 4.4.1. Recherche par voie naturelle

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

En effet, les actinobactéries rares constituent l'une des sources les plus prometteuses pour découvrir de nouveaux métabolites bioactifs. L'intérêt que suscitent ces bactéries dans ce domaine est surtout lié au fait que de nombreux antibiotiques intéressants ont été isolés de genres rares ou peu fréquents tels que *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Planomonospora*, etc. (Genilloud *et al.*, 2011).

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

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

- le choix du milieu de culture favorable (Hayakawa et Nonomura, 1984; 1987).
- l'utilisation des antibiotiques et autres agents antibactériens (Boudjella, 1994).
- Le pré-traitement des sols est l'une des méthodes en utilisant la chaleur sèche (Zakharova *et al.*, 2003).

### 4.4.2. Recherche par voie chimique

La découverte de nouveaux antibiotiques s'appuie également sur la synthèse chimique de nouvelles molécules, ou de molécules existantes modifiées, comme dans le cas de l'hémisynthèse. Celle-ci consiste à développer des dérivés d'antibiotiques dont on dispose, de façon à avoir des molécules plus actives, soit en modifiant la molécule d'origine de manière à la faire agir sur une cible légèrement différente, soit en lui adjoignant un inhibiteur du mécanisme de résistance lorsque celui-ci est connu (Maillié et Bastide, 2001).

A l'heure actuelle, les méthodes utilisées pour produire des molécules antibiotiques sont très complexes et ne sont pas économiquement rentables. La voie biologique reste la voie principale de synthèse de la plupart des antibiotiques (Joffin et Leyral, 2006).

## 5. *Planomonospora*

Le genre *Planomonospora* fut décrit pour la première fois par Thiemann en 1967, avec comme espèce-type *Planomonospora parontospora* DSM 43177<sup>T</sup>. Ce genre est très facilement reconnaissable par sa micromorphologie et des sporanges cylindriques sur le mycélium aérien, contenant chacun une seule spore en bâtonnet, droite ou légèrement incurvée, et mobile après sa libération grâce à des flagelles pérित्रiches. Le mycélium du substrat est stérile et non fragmenté (Thiemann *et al.*, 1967).

### 5.1. Taxonomie

Le genre *Planomonospora* appartient à la famille des *Streptosporangiaceae* (Goodfellow *et al.*, 1990) et fait partie de l'ordre des *Streptosporangiales* (Goodfellow, 2012).

Il y'a plus d'une vingtaine d'années, aucune nouvelle espèce du genre *Planomonospora* n'a été découverte ; Récemment deux nouvelles espèces ont été décrites désignées *P. corallina* (Suriyachadkun *et al.*, 2016) et *P. algeriensis* (Chaabane Chaouch *et al.*, 2017). A l'heure actuelle, il n'y a que 6 espèces qui sont connues: *P. parontospora* (Thiemann *et al.*, 1967), *P. venezuelensis* (Thiemann, 1970), *P. sphaerica*, *P. alba* (Mertz, 1994), *P. corallina* (Suriyachadkun *et al.*, 2016) et *P. algeriensis* (Chaabane Chaouch *et al.*, 2017).

### 5.2. Antibiotiques secrétés

Les espèces appartenant au genre *Planomonospora* ne produisent que 4 antibiotiques: la sporangiomycine, sécrétée par *P. parontospora* subsp. *antibiotica* JCM 3094<sup>T</sup> (Thiemann *et al.*, 1968), le thioestrepton et la sphaericine produits par *P. sphaerica* JCM 9374T (Mertz, 1994) et la planosporicine, élaborée par *Planomonospora* sp. DSM 14920<sup>T</sup> et *P. alba* NRRL 18924<sup>T</sup> (Castiglione *et al.*, 2007; Sherwood *et al.*, 2013). Ces antibiotiques, connus sous le nom de lantibiotiques, sont des peptides ribosomiques, post-traductionnelles modifiés (RiPPs) (Sherwood *et al.*, 2013; Sherwood et Bibb, 2013). Les lantibiotiques sont produits par un nombre réduit d'actinobactéries (Li *et al.*, 2012; Sherwood *et al.*, 2013), et ont des applications médicales, biotechnologiques, vétérinaires, etc. D'autres substances de la même famille sont actuellement en développement clinique, comme le cas des microbisporicine, actagardine et duramycine pour traiter les infections bactériennes (Gram positif multirésistantes), les infections à *Clostridium difficile* et la fibrose kystique, respectivement (Oliynyk *et al.*, 2010; Jabés *et al.*, 2011; Crowther *et al.*, 2013). La planosporicine qui est brevetée comme antibiotique 9751 (Hammami *et al.*, 2013), présente un large spectre antimicrobien *in vitro* et *in vivo* (chez la souris), contre des bactéries multirésistantes telle que *S. aureus* (y compris MRSA), *Streptococcus perfringens* et *Clostridium pneumoniae*. En raison de son activité inhibitrice de synthèse de la paroi cellulaire bactérienne et de sa faible toxicité, la planosporicine peut avoir une application pharmaceutique pour être utilisée comme une alternative aux  $\beta$ -lactames (Castiglione *et al.*, 2007).

### 6. *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été créé pour la première fois par Labeda *et al* en 1984, avec comme espèce-type *Sx. australiensis* ATCC 31497<sup>T</sup>. Il est, comme la grande majorité des actinobactéries, saprophyte, chimio-organotrophe hétérotrophe et aérobie stricte. Bien que ce genre soit minoritaire parmi les actinobactéries, il a pu être isolé à partir de plusieurs échantillons de sols sahariens, avec un pourcentage variant entre 8 et 15% (Sabaou *et al.*, 1998). De même, les travaux de Gommeaux *et al* en 2010 ont montré une certaine dominance de *Saccharothrix* dans des échantillons sableux prélevés des dunes, là où la matière organique est pratiquement inexistante.

## 6.1. Taxonomie

Actuellement, le genre *Saccharothrix* est classé dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (ordre des *Pseudonocardiales*). Après la création du genre, plusieurs nouvelles espèces ont été décrites. Certaines d'entre elles proviennent d'un reclassement à partir d'autres genres tels que *Nocardiopsis* et *Nocardia*, et ce, sur la base de la composition cellulaire en sucres diagnostiques et de la phylogénie (Labeda *et al.*, 2001). Cependant, plusieurs espèces de *Saccharothrix* ont été transférées dans d'autres genres; c'est le cas, par exemple, de *Sx. waywayendensis* et *Sx. aerocolonigenes*, rattachées à *Lentzea*, genre créé par Yassin *et al.* en 1995 et *Sx. flava* rattachée à *Lechevalieria*, créée par Labeda *et al.* en 2001. Jusqu'à présent, ce genre regroupe une vingtaine d'espèces (Euzéby, 2017).

## 6.2. Antibiotiques secrétés

Plusieurs travaux ont pu mettre en valeur les propriétés antagonistes chez des différentes espèces de *Saccharothrix*. En effet, ce genre secrète une multitude d'antibiotiques de nature chimique assez diversifiée. Parmi les premiers antibiotiques décrits, nous citerons la nocamycine, sécrétée par une souche de *S. syringae* (Brazhnikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979). On peut ainsi trouver des polyamines ou des aminoglycosides (Takahashi *et al.*, 1986), des benzoquinones (Takahashi *et al.*, 1986; Isshiki *et al.*, 1989), des glycopeptides (Takeuchi *et al.*, 1992), des nucléosides carbocycliques (Bush *et al.*, 1993), des composés phosphorés acides et hydrophiles (Takahashi *et al.*, 1995), des dithiopyrrolones (hétérocycles azotés et soufrés) (Lamari *et al.*, 2002), des heptadécaglycosides qui appartiennent à une nouvelle classe d'antibiotiques (Singh *et al.*, 2000), des anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004) et des macrolides (Zitouni, 2005). La sacchathridine A, un dérivé naphthoquinonique agissant comme inhibiteurs des prostaglandines, a été aussi isolée à partir d'une souche de *Saccharothrix* sp. (Nakae *et al.*, 2013). De même, Aouiche *et al.* (2012) ont montré qu'une souche de *Saccharothrix* sp. s'est avérée être productrice de chloramphénicol. Les études de Boubetra *et al.* (2012) ont également mis en évidence de nouveaux composés antimicrobiens, sécrétés par une nouvelle espèce de *Saccharothrix* désignée *S. tamanracentensis* (Boubetra *et al.*, 2015).

Certains antibiotiques sécrétés par les *Saccharothrix* spp. sont doués d'une activité antibactérienne (Gram positif et plus rarement Gram négatif), comme la swalpamycine B, ou antifongique comme le thiazolopyridine, ou encore antibactérienne et antifongique à la fois, comme les dithiopyrrolones, la dopsisamine et la formamycine. D'autres composés sécrétés présentent des activités antitumorales (ammocidine, pluraflavines), antivirales (fluvirucines), herbicides (phosphonothrixine et coformycine = nucléosides carbocycliques), ou inhibitrices de métalloprotéases ou d'autres enzymes (molécules WS75624).

# **Matériel et méthodes**

## Matériel et méthodes

### III. Matériel

#### 1. Souches d'actinobactéries

Deux souches d'actinobactéries ont fait l'objet de notre travail, une appartenant au genre *Planomonospora*, codée CCF, a été isolée par Chaabane Chaouch en 2014 à partir d'un sol du Hoggar, et une autre appartenant au genre *Saccharothrix*, codée MB29, a été isolée par Bouznada en 2014 à partir d'un sol de M'zab.

#### 2. Souches des germes cibles

Les germes cibles utilisés (tableau1) proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba.

**Tableau 1:** Les germes cibles utilisés dans différents tests

Microorganismes cibles	
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (Bs), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213(Sa), <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c, <i>Listeria monocytogenes</i> (Lm), <i>Micrococcus luteus</i> (Ml).
Bactéries à Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa), <i>Escherichia coli</i> E52 (Ec).
Levures	<i>Candida albicans</i> M2, <i>Candida albicans</i> M3.
Champignons filamenteux	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333 (Ac), <i>Aspergillus ochraceus</i> (Ao), <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251 (Af), <i>Aspergillus parasiticus</i> CBS 100926 (Ap), <i>Fusarium graminearum</i> (Fg), <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Foa), <i>Fusarium proliferatum</i> (Fp), <i>Fusarium culmorum</i> (Fc).

### IV. Méthodes

#### 1. Criblage de l'activité antagoniste des actinobactéries par la méthode des stries croisées

Cette méthode consiste à ensemercer les souches d'actinobactéries sur le milieu ISP2 solide pour la souche MB29 et le milieu Bennett solide pour la souche CCF. L'ensemencement a été effectué en un seul trait sur la bordure des boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 30°C pendant 10 jours, pour permettre la croissance des actinobactéries ainsi que la diffusion de leurs composés actifs. Après, les microorganismes cibles ont été ensemercés en stries perpendiculairement à l'actinobactérie. La lecture des résultats a été effectuée après 24 h pour les bactéries et les levures et 48 h pour les champignons filamenteux, en mesurant les distances d'inhibition entre la bordure de l'actinobactérie et le microorganisme cible.

#### 2. Cinétique de l'activité antibiotique

##### 2.1. Cinétique de la souche CCF

###### 2.1.1. Pré-culture

Les fragments mycéliens et les spores ont été inoculés dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu Bennett, qui ont été raclés à partir d'une culture de la souche CCF en boîte de Pétri âgée de 15 jours à l'aide d'un fil d'ensemencement stérile. Après 2 jours d'incubation à 30°C sous une agitation rotative dans un shaker à 250 rpm, cette pré-culture est utilisée pour inoculer le milieu de production.

###### 2.1.2. culture

Dans le but de déterminer le jour optimal de la production des antibiotiques, deux fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu Bennett liquide ont été ensemercées par 3 ml de la pré-culture de la souche CCF. Les cultures ont été incubées à 30°C en agitation permanente à 250 rpm dans un shaker. Des prélèvements de 2 mL ont été effectués aseptiquement toutes les 24 h pendant 12 jours. Ces prélèvements ont été centrifugés à 12000g pendant 10 min.

Un milieu ISP2 semi solide (12 g/l d'agar) pré-ensemencé par *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, a été coulé dans des boîtes de Pétri. Après sa solidification, des puits ont été réalisés à l'aide d'un emporte pièce de 10 mm de diamètre. Chaque puits reçoit une aliquote de 100 µl de surnagent.



Les boîtes ont été mises 2h à 4°C, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats s'effectue après 24h en mesurant le diamètre la zone d'inhibition autour du puits.

### **2.2.Cinétique de la souche MB29**

La production des antibiotiques de la souche MB29 sur milieu solide est suivie durant 12 jours par la méthode des cylindres d'agar contre *Staphylococcus aureus* (MRSA 639c), *Candida albicans* (M3) et *Aspergillus carbonarius* (M333). L'actinobactérie provenant du milieu ISP2 a étéensemencée de manière homogène en stries croisées sur ce milieu solide. Au cours de l'incubation (à 30°C), des cylindres d'agar (10 mm de diamètre) ont été prélevés quotidiennement à l'aide d'un emporte pièce, ensuite déposés aseptiquement sur la surface du milieu ISP2 (semi-solide) pré-ensemencé par les germes-cibles et coulé dans les boîtes de Pétri. Ces dernières ont été mises à 4°C durant 2 h. Elles sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. L'activité antibiotique est appréciée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition qui apparaissent autour des cylindres d'agar.

## **3. Production, extraction et purification des molécules bioactives**

### **3.1.Production des molécules bioactives**

#### **3.1.1. Production des molécules bioactives pour la souche CCF**

Un volume de 3 L du milieu Bennett liquide a été réparti sur des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml à raison de 100 ml. Ensuite, ces fioles ont étéensemencées par 3 ml de la pré-culture, puis incubées à 30°C sous une agitation de 250 rpm dans un Shaker jusqu'au jour de la production optimale.

#### **3.1.2. Production des molécules bioactives par la soucheMB29**

La culture de la souche MB29 consiste à ensemencer de manière homogène cette actinobactérie sur le milieu ISP2 solide. L'incubation a été effectuée à 30°C jusqu'au jour de la production optimale.

### **3.2.Extraction des molécules bioactives**

Ce procédé implique l'utilisation des solvants pour extraire les composés bioactifs à partir des milieux de culture.

### **3.2.1. Extraction des molécules bioactives produites par la souche CCF**

La culture de la souche CCF a été centrifugée à 12000 g, pendant 15 min pour récupérer le filtrat de culture, ensuite le filtrat a été mélangé dans une ampoule à décanter avec un volume égal au dichlorométhane. La phase organique a été récupérée après passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant le sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. L'extrait a été évaporé sous vide à 40°C, à l'aide d'un rotavapeur. Une fraction de cet extrait a été récupérée dans 1 ml de méthanol (MeOH) avant d'effectuer les tests d'antibiographie.

### **3.2.2. Extraction des molécules bioactives produites par la souche MB29**

Après l'achèvement de l'incubation de la culture de la souche MB29, une extraction méthanolique a été effectuée. Le milieu de culture contenant les molécules bioactives est découpé en petits cubes pour subir une macération agitée dans le MeOH pendant une nuit. Par la suite, l'extrait méthanolique a été évaporé sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapeur. Une fraction du résidu sec a été solubilisée dans 1 ml de MeOH, pour être testée par antibiographie.

### **3.2.3. Antibiographie**

La méthode utilisée pour l'antibiographie est celle de diffusion à partir des disques de papier. Les extraits obtenus, à partir des milieux liquide et solide, ont été testés contre *Staphylococcus aureus* (MRSA 639c) pour la souche CCF et MB29, ainsi contre *Candida albicans* (M3) et *Aspergillus carbonarius* (M333) pour la souche MB29 seulement. Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés par 60 µl de chaque extrait à tester, puis séchés à l'aide d'un séchoir à air froid. Après stérilisation sous UV (254 nm) durant 45 min, les disques sont déposés à la surface d'un milieu ISP2 (contenant 12 g/L d'agar) préalablement inoculé par le germe-cible et coulé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont mises à 4 °C pendant 2 h, puis incubées à 30 °C. La lecture des résultats est réalisée après 24 h à 48 h.

## **3.3.Purification des biomolécules**

### **3.3.1. Appareillage**

L'appareil HPLC utilisé est un chromatographe de type Waters constitué d'éléments suivants:

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

### **3.3.2. Conditions expérimentales**

Les extraits obtenus sont solubilisés, chacun dans 1 mL de MeOH, ultrafiltré (filtre de 0,2  $\mu$ m), puis injectés (80  $\mu$ L par injection).

Les conditions de séparation utilisées sont les suivantes:

La phase mobile est constituée d'un mélange MeOH-eau ultra pure précédemment dégazé pendant 15 min avec de l'hélium.

Le gradient de séparation diffère selon la nature de l'extrait purifié. Le choix est fait après plusieurs essais préliminaires. Cependant, dans tous les cas, nous avons utilisé un gradient continu linéaire qui varie entre 20 et 100% MeOH/eau bi-distillée.

Le débit de la phase mobile est de 2 mL/min et la longueur d'onde de détection dans l'UV est de 220 et 390 nm. A 220 nm, tous les composés sont détectés.

Les différentes fractions obtenues (jaunes et incolores) sont récupérées séparément puis concentrées à sec sous air comprimé. Elles sont testées par antibiographie afin de localiser activité. Une deuxième et éventuellement une troisième injection sont nécessaires pour la purification totale des fractions actives.

## **4. Antibiographie des fractions purifiées**

Après avoir récupéré les fractions, ces dernières ont été séchées, puis solubilisées dans un volume minimal de MeOH pour effectuer l'antibiogramme. Le procédé a été déjà décrit dans le paragraphe (3.3.2), mais cette fois-ci, les disques de papier sont imprégnés par les produits récoltés.

### **5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de molécules bioactives de la souche MB29**

La détermination des CMI est réalisée par la méthode de diffusion dans l'agar. Une série de dilutions de chaque fraction ayant montré une activité antibiotique (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 75 et 100 µg/mL) est incorporée dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive.

Les germes-cibles (bactéries, champignons et levures) sont ensemencés par point (en double) en déposant 1 µL de la suspension de chaque germe-cible (préalablement calibré à 10<sup>6</sup> UFC/ml) à la surface du milieu. Les CMI ont été réalisées contre 16 microorganismes-cibles: Quatre bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* MRSA 639c, *Listeria monocytogenes* et *Micrococcus luteus*), deux bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* E52), deux levures (*Candida albicans* M2 et *Candida albicans* M3) et huit champignons filamenteux (*Aspergillus carbonarius* M333, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* NRRL 3251, *Aspergillus parasiticus* CBS 100926, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium proliferatum* et *Fusarium culmorum*).

Après 24 à 48 h d'incubation à 30°C, la croissance des germes cibles a été évaluée par rapport au témoin sans antibiotiques. Les CMI sont déterminées en considérant les concentrations minimales qui inhibent totalement la croissance des germes.

### **6. Caractérisation partielle des molécules bioactives**

#### **6.1. Spectroscopie UV-visible**

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

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Shimadzu 260 entre 200 et 500 nm pour un produit complètement purifié par HPLC de la souche MB29.

#### **6.2. Spectrométrie de masse**

Cette technique permet de déterminer le poids moléculaire des antibiotiques en très faible quantité, ainsi que ceux des fragments qui en résultent après ionisation des ions parents.

L'analyse d'un composé de la souche MB29 par spectrométrie de masse a été réalisé par prestation de service au laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, France.

# **Résultats et discussion**

### Résultats et discussions

#### 1. Mise en évidence de l'activité antagoniste des deux souches d'actinobactéries

##### 1.1. Résultats

L'activité antimicrobienne des deux souches des genres *Planomonospora* et *Saccharothrix* a été évaluée par les méthodes des stries croisés et des cylindres d'agar, sur le milieu Bennet pour la souche CCF et sur le milieu ISP2 pour la souche MB29, contre 17 germes-cibles: 2 bactéries à Gram négatif, 5 bactéries à Gram positif, 2 levures et 8 champignons filamenteux.

La souche CCF a montré une activité antibactérienne, avec un spectre d'action étroit. Une activité moyenne à forte est notée contre les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* MRSA 639c, *Listeria monocytogenes* et *Micrococcus luteus*). Chez cette souche, la distance de la zone d'inhibition varie de 32 à 40mm. Aucune activité n'est détectée contre les bactéries à Gram négatif, les levures et les champignons. Quant à la souche MB29, elle a inhibé fortement la croissance des champignons filamenteux (5 à 39 mm), des levures (23 et 25 mm) et des bactéries à Gram positif (20 à 27 mm). En revanche, une très faible activité est remarquée contre les bactéries à Gram négatif (elle ne dépasse pas 2 mm) (tableau 2).

**Tableau 2:** Activité antagoniste des deux souches d'actinobactéries par la technique des stries croisées.

Germes cibles	Zone d'inhibition en mm	
	Souche CCF	Souche MB29
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	36	27
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	34	25
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	40	22
<i>Listeria monocytogenes</i>	32	20
<i>Micrococcus luteus</i>	36	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i> E52	-	2
<i>Candida albicans</i> M2	-	25
<i>Candida albicans</i> M3	-	23
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	-	34
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251	-	15
<i>Aspergillus parasiticus</i> CBS 100926	-	19
<i>Fusarium graminearum</i>	-	29
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	-	37
<i>Fusarium proliferatum</i>	-	5
<i>Fusarium culmorum</i>	-	31

- = absence de l'activité, \* = les diamètres des cylindres sont inclus dans les valeurs.

## 1.2. Discussion

La production d'antibiotiques chez les membres de la famille des *Streptosporangiaceae*, auxquels appartiennent le genres *Planomonospora*, est estimée à environ 6 % parmi les souches appartenant à des genres rares (Lazzarini *et al.*, 2000).

La souche de *Planomonospora* codée CCF est douée d'une activité antibactérienne uniquement. En effet, ce genre est connu pour produire peu d'antibiotiques à activité antibactérienne, mais aucun antifongique n'a été signalé, où seuls quatre antibiotiques antibactériens sont produits par ce genre: la sporangiomyicine, le thiostrepton, la planosporicine et la sphaericine (Thiemann *et al.*, 1968, Mertz, 1994, Castiglione *et al.*, 2007, Sherwood *et al.*, 2013).

Des travaux antérieurs effectués au sein du LBSM sur les *Planomonospora* ont montré la production d'antibiotiques actifs contre les bactéries à Gram positif et parfois contre les champignons, mais très rarement contre les bactéries à Gram négatif et les levures (Boudjella 1994 et 2007; Bouti 1997; Sabaou *et al.*, 1998).



Dans notre cas, la souche de *Planomonospora* étudiée est assez intéressante puisque son activité est dirigée contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, d'autant plus que ce dernier est connu pour causer des problèmes sévères de santé publique (Prescott *et al.*, 2008; Yinduo, 2014).

La souche MB29 du genre *Saccharothrix* a présenté une forte activité contre les bactéries à Gram positif, les champignons et les levures, mais l'activité contre les bactéries à Gram négatif était très faible. La résistance des bactéries à Gram négatif est le plus souvent due à des gènes mobiles sur des plasmides qui peuvent facilement se propager chez les populations bactériennes (Carattoli *et al.*, 2006; Carattoli, 2009). On note que la souche MB29 a inhibé fortement la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* responsable de la fusariose vasculaire du palmier dattier qui a été signalée comme l'un des microorganismes résistants à plusieurs antifongiques.

Plusieurs travaux ont montré des propriétés antagonistes intéressantes chez le genre *Saccharothrix*, vu qu'il est connu comme regroupant des souches et des espèces productrices de plusieurs antibiotiques d'une grande diversité structurale et à spectre d'action assez intéressant.

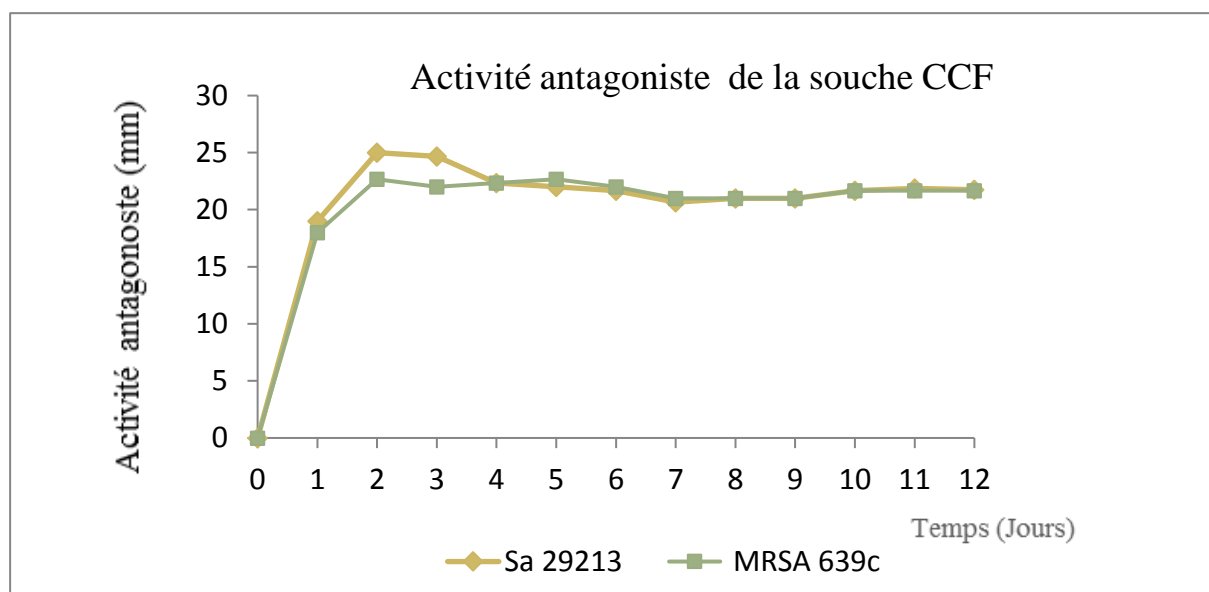
Les bactéries à Gram positif se sont montrées très sensibles contrairement aux bactéries à Gram négatif. Il est connu que les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries à Gram positif et possèdent de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Spratt, 1994; Prescott *et al.*, 2008; Gupta, 2011).

## **2. Suivi de l'activité antibiotique des souches étudiées**

### **2.1. Résultats**

#### **2.1.1. La souche CCF**

Afin de déterminer le jour de la production optimale des molécules antimicrobiennes, nous avons évalué chaque jour, et pendant 12 jours la sensibilité d'un représentant de chaque groupe microbien : *Staphylococcus aureus* MRSA 639c (MRSA) et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA) par la méthode de diffusion des puits. La cinétique de production des molécules antimicrobiennes par la souche CCF en milieu Bennett liquide est illustrée par la figure 7. L'activité contre les bactéries testées apparaît le 2<sup>ème</sup> jour et atteint son optimum le 3<sup>ème</sup> jour, puis elle se stabilise jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour.

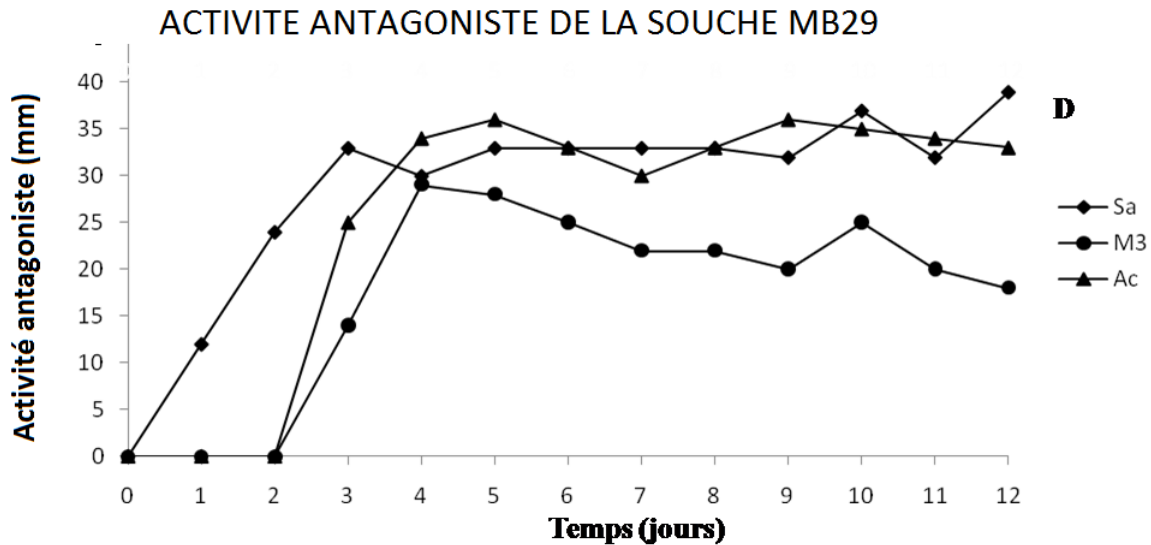


**Figure 7:** Cinétiques de l'activité antibactérienne de la souche CCF dans le milieu Bennett, contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline MRSA 639c et *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA).

### 2.1.2. La souche MB29

L'évaluation de l'activité antimicrobienne sur milieu solide ISP2 de la souche MB29 est également suivie durant 12 jours contre trois germes-cibles choisis parmi les plus sensibles, à savoir *Staphylococcus aureus* MRSA (bactérie à Gram positif), *Candida albicans* M3 (levure) et *Aspergillus carbonarius* M333 (champignons filamenteux).

Les résultats illustrés par la figure 8 montrent que l'activité antibactérienne commence à apparaître dès le premier jour. Elle reste plus ou moins stable entre le 3<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour. Par la suite, cette activité reprend son accroissement pour atteindre un autre pic le 10<sup>ème</sup> jour. Après une légère diminution (11<sup>ème</sup> jour), cette activité augmente de nouveau le 12<sup>ème</sup> jour. Les activités antilevurienne et anti-champignons filamenteux débutent synchronisées le 3<sup>ème</sup> jour. L'activité antilevurienne atteint son premier maximum le 4<sup>ème</sup> jour. Elle diminue légèrement entre le 4<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour, augmente de nouveau le 10<sup>ème</sup> jour (un deuxième pic d'activité) puis diminue de nouveau durant les 11<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jours. De même, l'activité anti-champignons filamenteux se manifeste par deux maxima qui sont enregistrés le 5<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour. Chaque maximum est suivi par une diminution graduelle de l'activité.



**Figure 8 :** Cinétiques de l’activité antibactérienne et antifongique de la souche MB29 dans le milieu ISP2, contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c, *Candida albicans* M3 et *Aspergillus carbonarius* M333.

## 2.2.Discussion

La cinétique de production des antibiotiques a été menée dans une condition liquide en agitation sur le milieu Bennett pour la souche CCF et le milieu ISP2 solide pour la souche MB29. La production d’antibiotiques est fortement influencée par la composition du milieu de culture et leur biosynthèse est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d’azote et de phosphate: induction et répression de la biosynthèse, rétro-inhibition et inactivation enzymatique (Martín *et* Demain, 1980).

La production des antibiotiques chez *Saccharothrix* sp. MB29 débute dès le 1<sup>er</sup> jour, tend à être relativement plus précoce et plus intense. À ce stade d’étude, et en tenant compte des résultats des cinétiques sur milieu solide, on peut suggérer la présence de deux composés bioactifs (ou même plus), synthétisés séparément, dont l’un est exclusivement antibactérien et l’autre est, à la fois, antibactérien et antifongique. Ce dernier n’exerce son activité antifongique que lorsque sa concentration atteint un certain seuil, d’où la probabilité (relativement faible) d’avoir un seul composé bioactif chez la souche MB29 (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

**3. Extraction et purification des molécules bioactives des souches CCF et MB29**

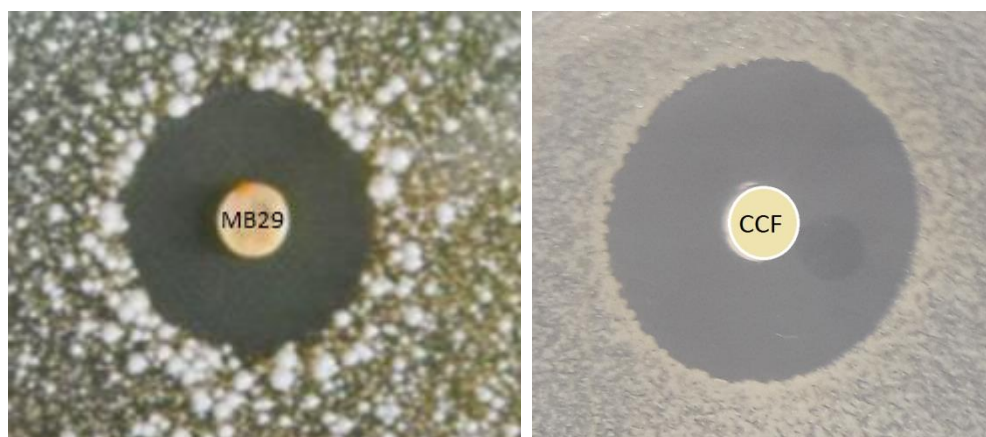
**3.1.Extraction des composés actifs et antibiographie**

Les molécules bioactives des deux souches d'actinobactéries ont été extraites dans les jours de production optimale, et ce, en utilisant le dichlorométhane comme solvant d'extraction pour la souche CCF et le méthanol comme solvant d'extraction pour la souche MB29. L'antibiographie des deux extraits organiques a permis de confirmer son activité antimicrobienne. Les résultats sont notés dans le tableau 3 et la figure 9.

**Tableau 3:** Activités antibactériennes de la phase organiques de *Planomonospora* sp. CCF et *Saccharothrix* sp. MB29.

Souche d'actinobactérie	Solvant d'extraction	Diamètre d'inhibition des microorganismes-cibles (en mm)			
		Sa	MRSA	M3	Ac
CCF	Dichlorométhane	21	27	ND	ND
MB29	Méthanol	45	47	25	34

ND= non déterminé. Le diamètre du disque de papier (6 mm) est compris dans les mesures.



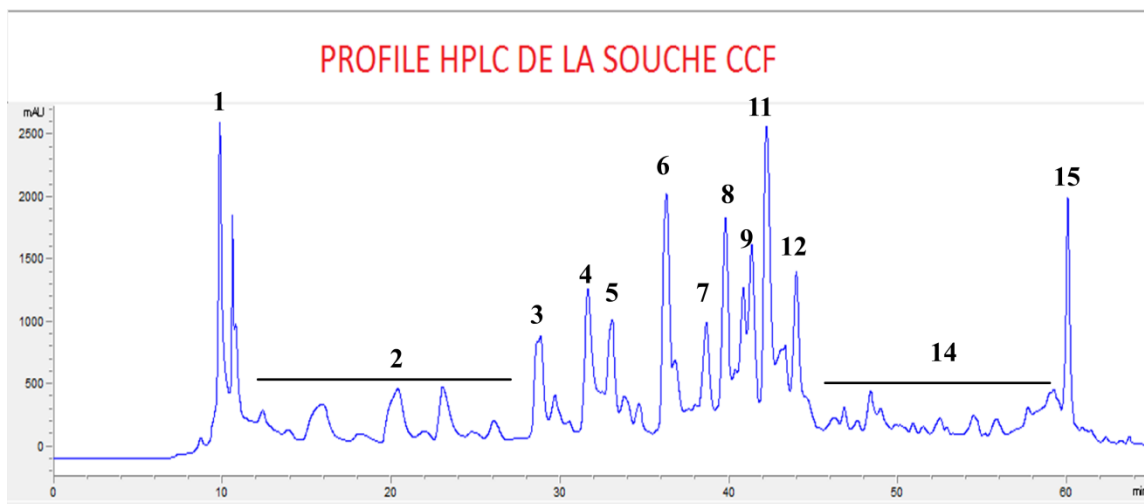
**Figure 9 :** Activité antimicrobienne des extraits organiques des souches CCF et MB29.

### 3.2.Purification des molécules bioactives par HPLC et antibiographie

Les deux extraits provenant des cultures (milieu ISP2 et Bennett) des deux souches CCF et MB29 ont été séchés à l'évaporateur rotatif à 40°C, puis solubilisés chacun dans 1 mL de méthanol afin de purifier les composés bioactifs par HPLC. Des injections de 80µL sont effectués jusqu'à épuisement du stock des extraits. La détection se fait à 220 nm (pour la souche CCF) et à 290 nm (pour la souche MB29).

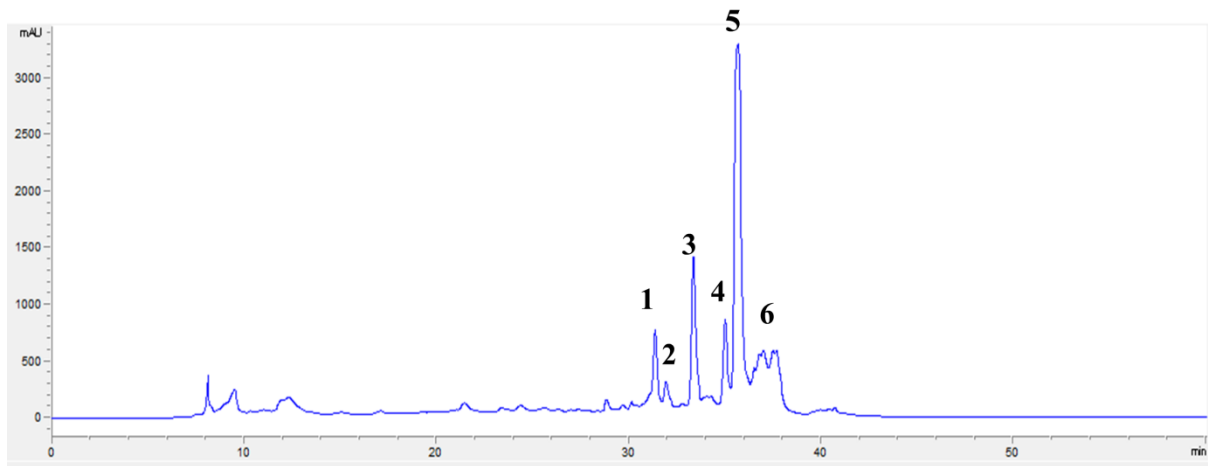
Leur profils d'élution sont illustrés par la figure 9 (pour la souche CCF) et la figure 10 (pour la souche MB29).

L'extrait organique de la souche CCF a donné plusieurs pics qui sont récoltés en 13 fractions (figure 9) alors que l'extrait organique de la souche MB29 est séparé en 6 fractions uniquement (figure 10).



**Figure 10:** Profil d'élution en HPLC (obtenus à 220 nm) de la première injection du produit de la souche CCF solubilisé auparavant dans le méthanol.

PROFIL HPLC DE LA SOUCHE MB29



**Figure 11:** Profils d'élution en HPLC (obtenus à 290 nm) de la première injection du produit de la souche MB29 solubilisé auparavant dans le méthanol.

Les activités antimicrobiennes ont été évaluées par la méthode de diffusion des disques de papier (6 mm de diamètre). Les extraits sont concentrés à sec, puis repris dans du méthanol et spotés à raison de 60 µl par disque.

La souche CCF sécrète plusieurs antibiotiques antibactériens, Cette activité est surtout dirigée contre les bactéries à Gram positif. En effet, l'analyse par HPLC et l'antibiographie des fractions purifiées ont révélé la présence d'au moins 4 antibiotiques (P1, P2, P14 et P15) qui sont actifs contre *S.aureus* ATCC 29213 sensible à la méticilline et *S.aureus* MRSA 639c.

L'analyse par HPLC de l'extrait de la souche MB29 montre la présence de cinq composés actifs nommés A1, A2, A3, A4 et A5. Ces derniers ont présenté une activité antibactérienne dirigée contre *S.aureus* MRSA pour le A1, le A2 et A3, et une activité antifongique dirigée contre *C.albicans*M3 et *A.carbonarius* pour le A4 et le A5.

Les germes cibles utilisés et les résultats du test d'activité sont présentés dans les tableaux 4 et 5.

**Tableau 4:** Activités des fractions purifiées par HPLC du produit de la souche CCF solubilisé dans le méthanol.

Produit	Activité (diamètre d'inhibition en mm)	
	Sa	MRSA 639c
P1	8	8
P2	9	15
P3	-	-
P4	-	-
P5	-	-
P6	-	-
P7	-	-
P8	-	-
P9	-	-
P11	-	-
P12	-	-
P14	11	17
P15	12	26

**Tableau 5:** Activités des fractions purifiées par HPLC du produit de la souche MB29 solubilisé dans le méthanol.

Produit	Activité (diamètre d'inhibition en mm)		
	MRSA 639c	M3	Ac
A1	22	-	-
A2	15	-	-
A3	14	-	18
A4	-	12	21
A5	-	24	30
A6	-	-	-

- = absence de l'activité

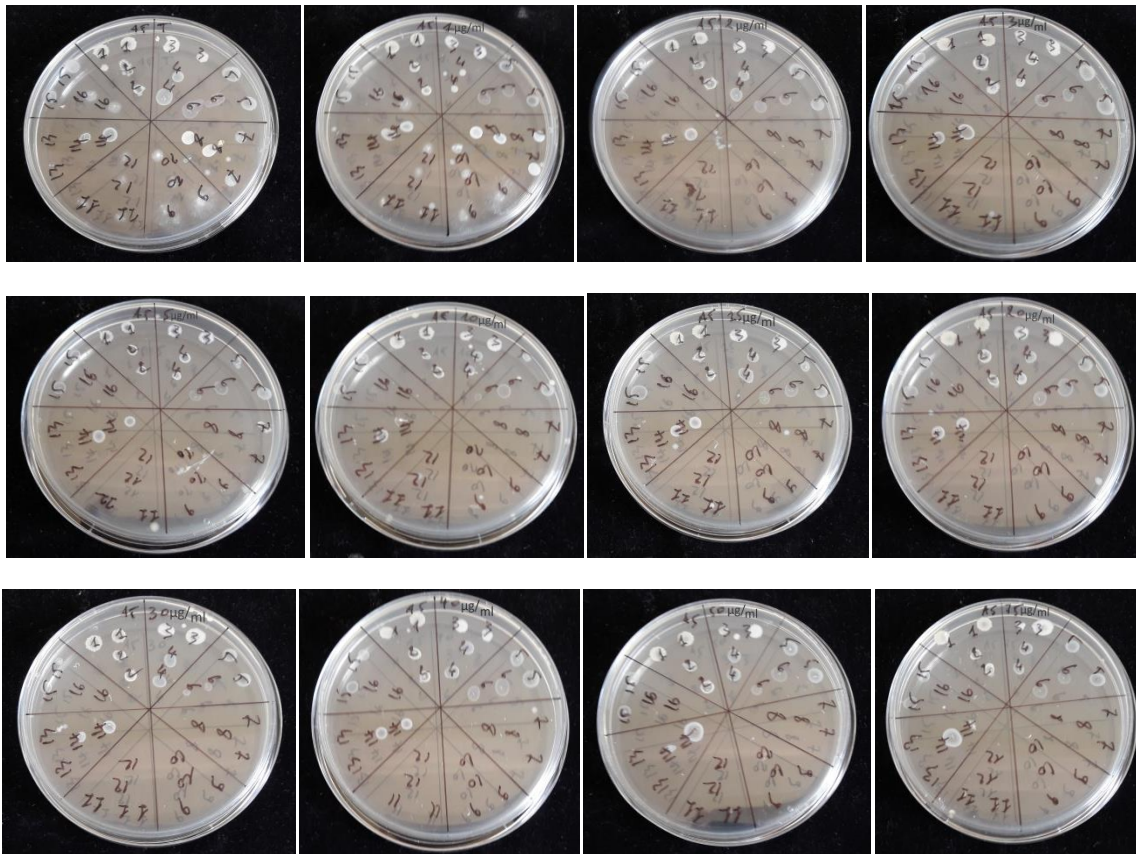
#### 4. CMI des fractions actives de la souche MB29

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été réalisées pour tous les composés produits par la souche MB29 et qui ont montré une activité, puis purifiés par HPLC, soit 5 composés antimicrobiens (de A1 à A5).



## Résultats et discussions

Pour l'ensemble des composés testés, les valeurs des CMI sont comprises entre 2 à 100 µg/mL contre les levures et les champignons filamenteux. Les valeurs des CMI contre toutes les bactéries sont supérieures à 100 µg/mL. Les microorganismes les plus sensibles sont les champignons filamenteux et les levures au produit A5 (figure 12) seulement, mais résistants pour le reste des produits. Les bactéries à Gram positif et négatif sont les microorganismes les plus résistants vers l'ensemble des produits (Tableau 6).



**Figure 12:** Concentrations minimales inhibitrices de l'antibiotique A5 de la souche MB29. 1= Bs, 2= MRSA, 3= Lm, 4= Ml, 5= Pa, 6= Ec, 7= M2, 8= M3, 9= Ac, 10= Ao, 11= Af, 12= Ap, 13= Fg, 14= Foa, 15= Fp, 16= Fc.



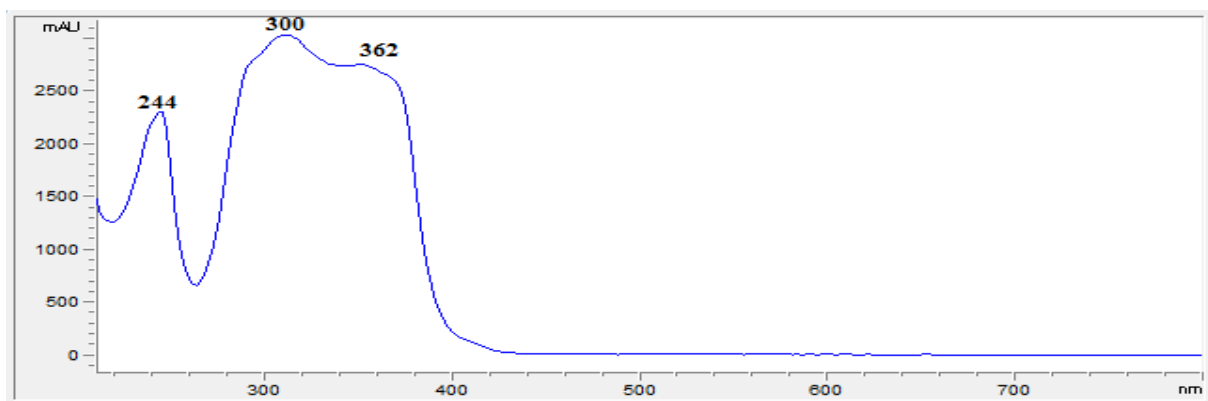
**Tableau 6:** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques A1, A2, A3, A4 et A5 sécrétés par *Saccharothrix* sp. MB29.

Microorganismes-cibles	Antibiotiques (µg/ml)				
	A1	A2	A3	A4	A5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Listeria monocytogenes</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Micrococcus luteus</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> E52	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Candida albicans</i> M2	>100	>100	>100	>100	2
<i>Candida albicans</i> M3	>100	>100	>100	>100	2
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	>100	>100	40	10	2
<i>Aspergillus ochraceus</i>	>100	>100	>100	15	2
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251	>100	100	50	10	2
<i>Aspergillus parasiticus</i> CBS 100926	>100	>100	>100	20	2
<i>Fusarium graminearum</i>	>100	>100	75	15	2
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	>100	>100	>100	15	2
<i>Fusarium proliferatum</i>	>100	>100	>100	30	2
<i>Fusarium culmorum</i>	>100	>100	30	15	2

## 5. Caractérisation partielle du produit A5

### 5.1.1. Spectroscopie UV-visible

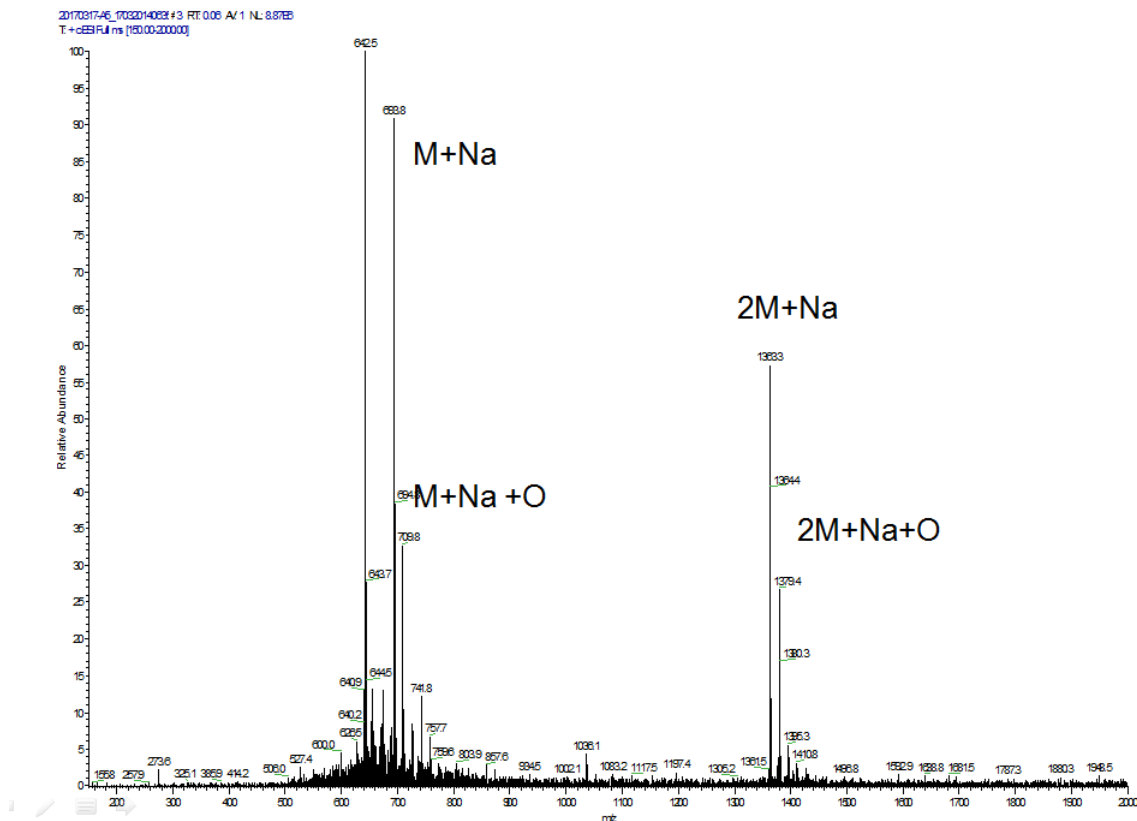
Le composé A5 de la souche MB29 a montré une excellente activité, ce qui nous a conduits à à lui faire une caractérisation chimique partielle. Le composé A5 de la souche MB29 a été analysé par spectrophotométrie UV-visible. Le spectre UV-visible obtenu possède trois pics d'absorption maximale, à 244 nm, à 300 nm et à 362 nm (figure13).



**Figure13 :** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique A5 de la souche MB29.

### 5.1.2. Spectrométrie de masse

La figure 14 représente le spectre de masse à haute résolution réalisé par nano-electrospray ionisation (ESI) de l'antibiotique A5. Des ions pseudomoléculaires  $M + Na = 683$  sont obtenus pour A5. La masse de ce dernier est donc de  $683 - 23$  (masse du sodium) = 670 Da.



**Figure 14 :** Spectre de masse du produit A5 (Méthode Nano ESI en mode négatif) sécrété par *Saccharothrix* sp. MB29.

## 6. Discussion

Nos souches d'actinobactéries produisent plusieurs antibiotiques ce qui concorde avec la littérature. En effet, ce phénomène est souvent rapporté chez les actinobactéries. Les travaux de Lamari *et al.*, 2002, Bouras *et al.*, 2008, Merrouche *et al.*, 2011 ont montré le potentiel assez intéressant de *Saccharothrix algeriensis* à produire plusieurs antibiotiques à la fois.

Les espèces du genre *Planomonospora* produisent 4 antibiotiques à savoir la sporangiomycine sécrétée par *P. parontospora* sub sp. *antibiotica* JCM 3094<sup>T</sup> (Thiemann *et al.*, 1968), le thiostrepton et la sphaericine élaborés par *P. sphaerica* JCM 9374<sup>T</sup> (Mertz, 1994) et la planosporicine produite par *Planomonospora* sp. DSM 14920<sup>T</sup> et *P. alba* NRRL 18924<sup>T</sup> (Castiglione *et al.*, 2007; Sherwood *et al.*, 2013) qui sont tous de nature peptidique.

Les résultats des CMI ont montré que les deux antibiotiques (A1 et A2) ne sont pas intéressants contre tous les germes cibles. Contrairement, les antibiotiques A3 et A4 présente une activité intéressante que contre les champignons. L'activité des molécules produites par le genre *Saccharothrix* est connue surtout pour être dirigée contre les champignons, parfois contre les bactéries à Gram positif et rarement contre les bactéries à Gram négatif (Braznikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979; Isshiki *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1999; Wang *et al.* 2000; Lamari *et al.*, 2002; Zitouni, 2005).

Quant à l'antibiotique A5, il possède une activité globalement assez intéressante et qui est particulièrement forte contre tous les champignons et les levures. La comparaison des CMI obtenues chez certaines souches et espèces du genre *Saccharothrix*, notamment celles issues du LBSM, montre que:

- L'activité antimicrobienne des antibiotiques de *Saccharothrix* sp. MB29 est meilleure que celle des mutactimycines et des macrolides sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA103 (Zitouni *et al.*, 2004; Zitouni, 2005).

- L'activité antibactérienne est moins bonne que celle de *Saccharothrix* sp. PAL54 (Aouiche *et al.*, 2012) et celle de *Saccharothrix* sp. SA198 (Boubetra 2013), mais l'activité antifongique est meilleure.

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

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

L'activité de ces antibiotiques ciblent surtout les bactéries à Gram positif, parfois les champignons et sont rarement dirigés contre les bactéries à Gram négatif (Takeuchi *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Lamari *et al.*, 2002; Zitouni, 2005).

# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et perspectives

Les actinobactéries, réputées pour leurs propriétés antagonistes, sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs de molécules bioactifs, y compris les antibiotiques. Toutefois, la découverte de nouveaux antibiotiques à partir des actinobactéries est devenue de plus en plus difficile. Cette difficulté est accentuée par l'émergence accrue de nombreux cas pathologiques issus des résistances développées par les microorganismes pathogènes. Devant cette émergence, plusieurs stratégies dans le monde ont été entreprises afin de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques. L'une d'elles vise l'exploitation des souches appartenant à des genres d'actinobactéries rares ou peu fréquents (autres que le genre *Streptomyces*) et provenant d'écosystèmes extrêmes et particuliers.

Le présent travail rentre dans ce cadre et vise à étudier de la production, l'extraction et la purification de quelques composés actifs extraits à partir de deux souches d'actinobactéries isolées du sol du Sahara algérien.

Notre travail nous a permis de révéler le potentiel antagoniste de nos deux souches d'actinobactéries contre divers germes cibles. L'activité de la souche CCF est exclusivement antibactérienne et elle est dirigée contre les bactéries à Gram positif uniquement alors que l'activité de la souche MB29 est antibactérienne (contre les bactéries à Gram positif) et antifongique à la fois.

La production maximale des antibiotiques est obtenue au 3<sup>ème</sup> jour d'incubation pour la souche CCF et au 5<sup>ème</sup> jour pour la souche MB29 et reste relativement stable jusqu'au dernier jour d'incubation. L'analyse par HPLC des extraits organiques de ces deux souches montre que cette activité antibiotique est le résultat de l'action de 4 composés actifs chez la souche CCF et 5 composés actifs chez la souche MB29.

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques sécrétés par la souche de *Saccharothrix* sp. MB29 se sont révélées être assez élevées contre les bactéries, les levures et les champignons filamenteux, sauf pour l'antibiotique A5 qui a présenté un excellent résultat contre les levures et les champignons.

Le travail effectué ouvre des perspectives multiples qui concernent:

- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques sécrétés par la souche *Planomonospora* sp. CCF.
- La détermination des structures chimiques des antibiotiques P15 de la souche *Planomonospora* sp. CCF et A5 de la souche *Saccharothrix* sp. MB29 par spectrophotométrie infra-rouge et surtout par RMN (la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13).
- La recherche des activités biologiques autre qu'antibiotique des deux souches étudiées telles que les activités antitumorales et antiparasitaires.

# **Références bibliographiques**



### Références bibliographiques

#### A

- Ait Barka E., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk HP., Clément C., Ouhdouch Y., Gilles P. and Wezel V. (2015).** Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **80**:1– 43.
- Anne Van Der M., Worsley SF., [Hutchings MI.](#), [van Wezel GP.](#) (2017).** Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *Microbiol Rev.*, **41**(3): 392-416.
- Aouiche A. (2011).** Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxinogènes pour l'Homme : isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Mémoire de Magister en microbiologie, Université Djillali Liabès de Sidi-Bel-abbès. P 127.
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F. and Lebrihi A. (2012).** *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol producing strain isolated from a Saharan soil. *World. J. Microb.Biot.*, **28** (3): 943-951.
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F. and Lebrihi A. (2012).** *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol producing strain isolated from a Saharan soil. *J.,Microb. Biot.*, **28** (3): 943-951.

#### B

- Badji B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycetes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. p 226.
- Boubetra (2013).** Nouvelles espèces de *Saccharothrix* Isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par *Saccharothrix* sp. SA198. Doctorat en sciences alimentaires, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie. p 157.
- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A. and F. Mathieu. (2012).** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, **168** (4): 223-230.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P. and Sabaou N. (2013).** *Saccharothrix saharensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63** (10): 3744-3749.

- 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. p 177.
- 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, Alger. p 188.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2006).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, **161** (4) : 288-298.
- Bougnicourt M. (1995).** Dictionnaire de microbiologie générale: la vie racontée par les bactéries, ellipses (Eds). p 991.
- Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2008).** Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Bioch.*, **43**: 1244–1252.
- Bousseboua H. (2002).** Element de microbiologie générale. Edition d'Université Mentouri d'Oran : p 17.
- 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. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. p 149.
- Brazhnikova M. G., Konstantinova N.V., Potapova N. P. and Tolstykh I. V. (1977).** Physicochemical characteristics of the new antineoplastic antibiotic, nocamycin. *Antibiot.*, **22** : 486-489.
- Bull AT. and Stach J. (2005).** Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Lee.*, **87**:65–79.
- Bush B., Fitchett G., Gates D. and Langely D. (1993).** Carbocyclic nucleosides from a species of *Saccharothrix*. *Phytoch.*, **32** (3) : 737-739.
- Bush B. D., Fitchett G. V., Gates D. A. and Langely D. (1993).** Carbocyclic nucleosides from a species of *Saccharothrix*. *Phytochem.*, **32** (3): 737-739.
- Butler M. (2004).** The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.*, **67**: 2141–2215.

### C

- Chaabane Chaouch F., Bouznada K., Tata S., Bouras N. and Sabaou N. (2017).** *Planomonospora algeriensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a Saharan soil of Algeria. *J. Antibiot.*, **95** : 210-355.
- Carattoli A. (2009).** Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **53** (6) : 2227-2238.
- Carattoli A., Miriagou V., Bertini A., Loli A., Colinon C., Villa L., Whichard J. and Rossolini G. M. (2006).** Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg. Infect. Dis.*, **12** (7) : 1145-1148.

- Castiglione F., Cavaletti L., Losi D., Lazzarini A., Carrano L., Feroggio M., Ciciliato I., Corti E., Candiani G., Marinelli F. and Selva E. (2007).** A novel lantibiotic acting on bacterial cell wall synthesis produced by the uncommon actinomycete *Planomonospora sp.* *Biochemistry.*, **46**:5884–5895.
- Castiglione F., Cavaletti L., Losi D., Lazzarini A., Carrano L., Feroggio M., Ciciliato I. and Chorin A.C. (2009).** Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiolyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat, Université I.N.S.A. Toulouse, France. p 238.
- Corti E., Candiani G., Marinelli F. and Selva E. (2007).** A novel lantibiotic acting on bacterial cell wall synthesis produced by the uncommon actinomycete *Planomonospora sp.* *Bioc.*, **46**: 5884–5895.
- Crowther G.S., Baines S.D., Todhunter S.L., Freeman J., Chilton C.H. and Wilcox M.H. (2013).** Evaluation of NVB302 versus vancomycin activity in an in vitro human gut model of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.*, **68**(1): 168–176.

### D

- Davies J. and Mazel D. (1997).** Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofut.*, **170** : 14-17.
- Demain A.L. and Sanchez S. (2009).** Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.*, **62**, 5-16.
- Demirdjian H. et Pontue M. (2006).** La pénicilline I. Découverte d'un antibiotique. *J. Biotechnol.*, **78**: 166–192.
- Dinech R., Srinivasan V., Sheeja T., Muthuswamy A., and Srambikkal H. (2017).** **Endophytic actinobacteria: Diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters.** *J Critical Rev Microbio.*, **43** (10) : 546-566.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A. (2002).** Microbial technologies for the discovery of novel bioactivemetabolites. *J. Biotechnol.*, **99**: 187–198.
- Drew S. and Demain A. (1977).** Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.*, **31** : 343-356.
- Driche E. (2010).** Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. p 121.

### E

- Epaulard O. and Brion P. (2009).** Phénicolés (chloramphénicol et thiamphénicol). *Trait Méd Akos.*, **10** :5-0070.

### G

- Genilloud O., González I., Salazar O., Martin J., Tormo J. and Vicente F. (2011).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 375- 389.
- Gommeaux M., Barakat M., Montagnace G., Christen R., Guyotg F. and Heulin T. (2010).** Mineral and Bacterial Diversities of Desert Sand Grains from South-East Morocco. *Geomicro J.*, **27** : 76-92.
- Goodfellow M. (2012).** Actinobacteria phyl. nov. *In*: Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K.i., Parte A (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York.* p 33.
- Goodfellow M., Stanton L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. (1990).** Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, **136** : 19-36.
- Gozalbes R., Khan A. and Takei M. (2000).** Anti-*Toxoplasma* Activities of 24 Quinolones and Fluoroquinolones In Vitro: Prediction of Activity by Molecular Topology and Virtual Computational Techniques. *Antimicrob. Ag Chem.*, **44** (10) : 2771-2776.
- Grace Yim. (2011).** L'Attaque des superbactéries: Résistance aux antibiotiques. *The Science Creative Quarterly. Issue Six. Lapsus Nivium.*
- Gupta R. (2011).** Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Ant van Lee.*, **100** (2): 171-182.

### H

- Hamedi J., Mohammadipanah F., Amoozegar M. and Dehghan S. (2007).** Isolation Of A New Moderately Halophilic Broad-Spectrum Antibiotic Producing *Actinobacter Jundishapur. Journal of Natural Pharmaceutical Products.*, **2**(2): 94-104.
- Hammami R., Fernandez B., Lacroix C. and Fliss I. (2013).** Anti-infective properties of
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1984).** HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. Annual Meeting of the Actinomycetologists, Osaka, Japan. p 6.
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1987).** Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.*, **65** : 501-509.
- Horvath G., Brazhnikova M., Konstantinova N., Tolstykh I. and Potapova N. (1979).** The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiot* **32**(6) :555–558.

### I

- Isshiki K., Sawa T., Naganawa H., Matsuda N., Hattori S., Hamada M. and Takeuchi T. (1989).** 3-O-isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-O-isobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot.*, **42** (3): 467-469.

### J

- Jabés D., Brunati C., Candiani G., Riva S., Romanó G. and Donadio S. (2011).** Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-resistant Grampositive pathogens. *Antimic Ag Chem.*, **55**(4):1671–1676.
- Joffin J.N. and Leyral.G. (2006).** Microbiologie technique -Tome 1: Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine. p 368.
- Johnson J., Citarasu T. and Helen M. (2012).** Screening of antibiotic producing actinomycetes from streams. *J., Chem. Bio. Phy. Sci.*, **2** : 1363-1370.
- Jose P. and Jebakumar S. (2013).** Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front Microbi.*, **4**: 2-40.
- Jose P., Santhi V. and Jebakumar S. (2011).** Phylogenetic-affiliation, antimicrobial potential and PKS gene sequence analysis of moderately halophilic *Streptomyces* sp. inhabiting an Indian saltpan. *J Basic Microbiol.*, **51**:348–356.

### K

- Kalinovskaya N., Kalinovsky A., Romanenko L., Dmitrenok P. and Kuznetsova T. (2010).** New angucyclines and antimicrobial diketopiperazines from the marine mollusk-derived actinomycete *Saccharothrix espanaensis* An 113. *Nat. Prod. Commun.*, **5** (4): 597-602.
- Karasawa T. and Steyger P. (2011).** Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity. *Integr. Biol.*, **3** : 879-886.
- Kim Y., Furihata K., Shimazu A., Furihata K. and Seto H. (1991).** Isolation and structural elucidation of sekothrixide, a new macrolide effective to overcome drug-resistance of cancer cells. *J., Antibiot.*, **44** : 1280-1282.
- Kinoshita N., Igarashi M., Ikeno S., Hori M. and Hamada M. (1999).** *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomic studies. *Actinomyc.*, **13**: 20–31.
- Kohanski M., Dwyer B., Hayete C., Lawrence A. and Collins A. (2007).** A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell. J Nat Prod.*, **130**: 797-810.

### L

- Labeda D. P. and Lyons A. J. (1989).** *Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39** (3): 355-358.
- Labeda D. P., Testa R. T., Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A. (1984).** *Saccharothrix*, a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardioopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34** (4): 426-431.
- 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, fermentation, isolation and biological activities. *J., Antibiot.*, **55** : 696-701.

- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. and Tillequin F. (2002).** New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **55** (8): 702-707.
- Lamsaïf, D. (1992).** Effects des sources d'azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium. Thèse de Doctorat de l'INPL de Nancy.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2000).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Ant van Lee.*, **79** : 399–405.
- Li X., Daniel J. and O'Sullivan J. (2012).** Contribution of the Actinobacteria to the growing diversity of lantibiotics. *Biotechnol Lett.*, **34**:2133–2145.

### M

- Mallié M. and Bastide J.M. (2001).** Les nouveaux antifongiques et leurs stratégies de recherche. *Rev Fran Labo.*, **332** : 63-70.
- Mann J. (2001).** Natural products as immunosuppressive agents. *Nat Prod Rep.* **18**:417–430.
- Martín J. and Demain L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, **44** :230-251.
- Matsuo N., Negishi A. and Negishi Y. (2003).** Jpn. Kokai Tokkyo Koho, p 6.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F. and Lebrihi A. (2011).** Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *J Appl Env Microbio.*, **77**: 6710-6714.
- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010).** Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J. Nat. Prod.*, **73** :1164-1166.
- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2011).** New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol. Lett.*, **318** : 41-46.
- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2011).** New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Microbiol Lett*, **318**(1): 41-6.
- Mertz F.P. (1994).** *Planomonospora alba* sp-nov and *Planomonospora sphaerica* sp-nov, 2 new species isolated from soil by baiting techniques. *Int J Syst Bacteriol.*, **44**(2): 274–281.
- Michael A., Kohanski I., Daniel J., Dwyer V. and Collins J. (2010).** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.*, **8** (6): 423–435.
- Mohamed S. and Galal A. (2005).** Identification and antiviral activities of some halotolerant
- Murakami R., Shinozaki J., Kajiura T., Kozono I., Takagi M., Shin-Ya K., Seto H. and Hayakawa Y. (2009).** Ammocidins B, C and D, new cytotoxic 20-membered macrolides from *Saccharothrix* sp. AJ9571. *J. Antibiot*, **62** : 123-127.



**Murakami R., Tomikawa T., Shin-Ya K., Shinozaki J., Kajiura T., Kinoshita T., Miyajima A., Seto H. and Hayakawa Y. (2001).** Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependent cells from *Saccharothrix* sp. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **54** (9): 714-717.

**Murakami R., Tomikawa T., Shin-Ya K., Shinozaki J., Kajiura T., Seto H. and Hayakawa Y. (2001).** Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependant cells from *Sacckarothrix* sp. I. Production, isolation and biological activity. *J. Antibiot.*, **54** (9): 710-713.

### N

**Nakae K., Kurata I., Kojima F., Igarashi M., Hatano M., Sawa R., Kubota Y., Adachi H. and Nomoto A. (2013).** Sacchathridine A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. *J. Nat.*, **76** (4):720-2.

### O

**Oliynyk I., Varelogianni G., Roomans G.M. and Johannesson M. (2010).** Effect of duramycin on chloride transport and intracellular calcium concentration in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis epithelia. *APMIS.*, **118**(12):982–990.

### P

**Perry D., Tone J. and Maeda H. (1990).** Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*. (Pfizer Ltd., UK). Brit. UK Pat. Appl, p 28.

**Powell N. and Roush W. (2001).** Studies on total synthesis of formamicin: synthesis of the C(1)-C(11) fragment. *Org. Lett.*, **3** : 454-456.

**Prescott L., Harley J. and Klein D. (2008).** Microbiologie, *De Boeck Université*. p 1088.

### R

**Ramijan K., Gilles P., Wezel V. and Claessen D. (2017).** Séquence du génome de l'actinomycète filamenteuse *Kitasatospora viridifaciens*. *Geno Ann.*, **5** (6): 15-60.

**Räty K., Kantola J., Hautala A., Hakala J., Ylihonko K. and Mantsala P. (2002).** Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene.*, **293**:115–122.

**Rohr J. and Thiericke R. (1992).** Angucycline group antibiotics. *Nat. Prod Rep.*, **9** : 101-137.

### S

**Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. and Germain P. (1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Séch.*, **9** (2): 147-153.

- Sato T., Hirayama F. and Saito T. (1991).** A new alkaloid antibiotic tetrazomine. Structure determination. *J. Antibiot.*, **44** : 1367-1370.
- Scott W., Bailey Bonet B., Zacharia V., Vineetha M., Dylan J., Clung M and Matthew F. (2017).** Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In situ. *Front Microbi.*, **7**: 21-49.
- Sherwood E.J. and Bibb M.J. (2013).** The antibiotic planosporicin coordinates its own production in the actinomycete *Planomonospora alba*. *Proc Natl Acad Sci.*, **110**(27): 2500–2509.
- Sherwood E.J., Hesketh A.R. and Bibb M.J. (2013).** Cloning and analysis of the planosporicin lantibiotic biosynthetic gene cluster of *Planomonospora alba*. *J Bacteriol.*, **195** (10): 2309–2321.
- Singh M. P., Petersen P. J., Weiss W. J., Kong F. and Greenstein M. (2000).** Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **44** (8): 2154-2159.
- Singh M., Petersen P., Weiss W., Kong F. and Greenstein M. (2000).** Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **44** (8): 2154-2159.
- Sohrab H. (2005).** Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from endophytic fungi and the plant *Prismatomeris tetrandra* and synthesis of Ochromycinon. PhD thesis. Paderborn university. Bangladesh. p 151.
- Solanki R. and Khanna M. (2008).** Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol.*, **48**: 410–431.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.*, **7**: 373–390.
- Spratt B. (1994).** Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science.*, **264**: 388–393.
- 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. p 203.
- Sugawara T., Tanba T., Kaneda Y., Yamamoto H. and Adachi T. (1999).** Antifungal thiazolylpyridine compound from *Saccharothrix* species and pharmaceutical compositions containing it. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.* p 10.
- Suriyachadkun C., Chunhametha S., Thawai C., Tamura T., Potacharoen W., Kirtikara K. and Sanglier J. J. (2016).** *Planotetraspora thailandica* sp. nov., isolated from soil in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **59** :992–997.

### T

- Takahashi A., Hotta K., Saito N., Morioka M., Okami Y. and Umezawa H. (1986).** Production of novel antibiotic, dopsisamine by new subspecies of *Nocardopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot.*, **39** (2): 175-183.



- Takahashi S., Takeuchi M., Enokita R., Sakaida Y., Haruyama H., Nakamura T., Katayama T. and Inukai M. (1995).** Galacardines A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot.*, **45** (10): 297-305.
- Takahashi Y. and Omura S (2003).** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol.*, **49**(3):141–154.
- Takeuchi M., Takahashi S., Enokita R., Sakaida Y., Haruyama H., Nakamura T., Katayama T. and Inukai M. (1992).** Galacardines A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot.*, **45** (10): 297-305.
- Thiemann J.E. (1970).** Study of some new genera and species of the *Actinoplanaceae*. In: *The Actinomycetales*. Prosser H. (Ed.). VEBG. Fisher Verlag, Jena., p 245-247.
- Thiemann J.E., Coronell C., Pagani H., Beretta G., Tamoni G. and Arioli V. (1968).** Antibiotic production by new form-genera of *Actinomycetales*. I. Sporangiomycin, an antibacterial agent isolated from *Planomonospora parontospora* var. *antibiotica* var. nov. *J. Ant.*, **5** : 15-25.
- Thiemann J.E., Pagani H. and Beretta G. (1967).** A new genus of the *Actinoplanaceae*: *Planomonospora* gen. nov. *G. Microbiol.*, **15**: 27–38.
- Tipper D. (1985).** Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther. J Basic Microbiol.*, **27**: 1- 35.
- Tsuboya S., Takayuki D., Takenori I. and Kenji H. (1996).** - Substance P antagonists manufacture with microorganism. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, p 16.

### V

- Vertesy L., Barbone F., Cashmen E., Decker H., Ehrlich K., Jordan B., Knauf M., Schummer D., Segeth M., Wink J. and Seibert G. (2001).** Pluraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiot.*, **54** :718-29.

### W

- Wang Z., Li S. and Heide L. (2000).** Identification of the coumermycin A, biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* and biochemical SSM 40489. *Antimicro. Ag Chem.*, **44** : 3040-3048.

### Y

- Yala D., Merad A., Mohamedi D. and Ouar Korich M. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Med de Mag.*, **2** : 5-12.
- Yinduo J. (2014).** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols, *Humana Press*. p 353.

### Z

- Zakharova O.S., Zenova G.M., and Zvyagintsev D.G. (2003).** Some approaches to the selective isolation of actinomycetes of the genus *Actinomadura* from soil. *Microbiol.*, **72**: 110-113.

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

**Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005).** *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.*, **156** (10): 984-993.

**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** (6): 367-372.

# **Annexes**

## Annexes

### Milieux de culture

#### 1. Milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955)

Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g, eau distillée: 1000 mL; agar: 12 g; pH = 7,3.

#### 2. Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL; pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

#### 3. Gélose nutritive (Waksman, 1961).

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.