

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB – Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie

**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

**Option : Microbiologie**

**Thème**

***Saccharothrix algeriensis: isolement, taxonomie  
et production d'antibiotique***

Présenté par:

Date de soutenance:

**15/ 07/ 2021**

☆ **DJELLOUL BEN SOULTANE Kaouther**

☆ **HAMRANI Marwa**

**Devant le jury :**

- |                           |                  |                     |
|---------------------------|------------------|---------------------|
| • <b>Dr. CHABANE D.</b>   | <b>USDB 1</b>    | <b>Présidente</b>   |
| • <b>Dr. LOUNACI L.</b>   | <b>USDB</b>      | <b>Examinatrice</b> |
| • <b>Dr. MERROUCHE R.</b> | <b>ENS-KOUBA</b> | <b>Promotrice</b>   |

**Promotion: 2020/2021**

## *Remerciement*

*Au terme de ce modeste mémoire, nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH**, qui nous a donné la force et la volonté pour arriver au bout de nos études.*

*Nous tenons à exprimer notre profond gratitude aux membre du jury :*

*Madame **CHABANE D.** maitre de conférences B à l'Université de Saad Dahleb Blida qui nous fait l'honneur de présider notre jury.*

*Madame **LOUNACI L.** maitre de conférences B à l'Université de Saad Dahleb Blida pour avoir ménagé son temps afin d'examiner ce travail.*

*Nos profond gratitude s'adressant aussi et surtout à notre promotrice **MERROUCHE R.**, maitre de conférences A à l'E.N.S de Kouba pour son aide, sa disponibilité, sa gentillesse, ses orientation fructueuses, et avoir mis à notre disposition les ressources nécessaire à la réalisation de ce thème .*

*Nous ne manquant pas de remercier profondément tous les enseignants qui ont contribué à nous transmettre l'inestimable trésor qui est le savoir.*

## *Dédicace*

*C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie le fruit de ce modeste travail comme geste de gratitude à savoir :*

*A la plus gentille mère au monde **Naçira**, qui m'a soutenue et encouragé durant ces années d'étude, la seule qui m'a donné tout ce qu'elle a pour être ici aujourd'hui.*

*A mon père **Djelloul**, qui m'a toujours motivé et poussé pour faire mieux.*

*A mon frère et meilleur ami **Mohamed** la personne qui a abandonné ses rêves et sa vie pour réaliser les miens, par ses sacrifices et ses encouragements, qui a toujours aimé me voir dans des hauts.*

*A mon soutien moral et source de joie et de bonheur, mon fiancée **Dhya eldinne** pour l'encouragement, l'aide et l'amour qu'il m'a toujours accordé.*

*A mes sœurs **Narimenne** et **Thinhinene** pour l'amour qu'elles me réservent, que Dieu les garde pour moi*

*A mes frères **Younes Akram** et **Bemira**. Mes petites anges **Alaa**, **Rafik** et **Tassim***

*A toute ma famille et sur toute ma belle-famille.*

*A ma chère amie et mon binôme **Marwa** qui m'a partagé les moments de joie ainsi que les durs moments. Je la souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*A mes amies : **Amina**, **Sarah**, **Nesrine**, **Naila**, **Amel**, **Bouchra**, **Hedjer** et **Samira**.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Je dédie affectueusement ce travail.*

**KAOUTHER**

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A ma très chère maman **FARIDA** pour ses sacrifices tout au long de mon parcours et qui me pousse vers l'éclat ; que dieu la protège pour moi et la donne une vie plein de santé.*

*A mon père **ABDELLAH**, ma source de force, je le remercie de me protéger et de m'offrir le meilleur.*

*A mon chère fiancé **ABDELBAKI** pour son soutien, et ses encouragements pour que j'atteigne les plus hauts et surtout son amour qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*A mes sœurs **FATIMA ZAHRA, LAMIA, DOUNIA** et **ANFEL**.*

*A tout ma famille surtout mes tantes **FOUZIA** et **NADIA**.*

*A mon chère binôme **KAOUTHER**, que j'ai la trouvé dans les bons et les mauvaises moments, je la souhaite la réussite et une vie plein de joie.*

*A mes amis **NAILA, THINHINANE, CHAHRAZED, SAMIA** et **YOUSSRA** pour tous les moments inoubliables que j'ai passés avec elles.*

*A tous ceux qui m'aiment.*

*Je dédie ce travail*

*MARWA*

# TABLE DE MATIERE

Liste des abréviations

Index des figures

Index des tableaux

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction générale ..... 1

## CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Les actinobactéries

1. Définition et caractéristiques générales des actinobactéries ..... 3
2. Critère d'identification des actinobactéries ..... 4
3. Distribution des actinobactéries ..... 9
4. Importance des actinobactéries ..... 9

### II. Le genre *Saccharothrix*

1. Caractéristiques et position taxonomique ..... 10
2. Les espèces appartenant au genre *Saccharothrix* ..... 11
3. Métabolites secondaire secrétés par le genre *Saccharothrix* ..... 12

### III. Les antibiotiques

1. Généralités ..... 15
2. Production des antibiotiques ..... 15
3. Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques ..... 15
  - 3.1 Effet nutritionnel ..... 15
  - 3.2 Facteurs physico-chimiques et environnementaux ..... 16
  - 3.3 L'inoculum ..... 17
4. Purification des antibiotiques ..... 17
5. Détermination des structures chimiques des antibiotiques ..... 17
  - 5.1 Spectroscopie UV-Visible ..... 18

5.2 Spectroscopie Infra Rouge .....	18
5.3 Spectrométrie de masse .....	18
5.4 Résonance magnétique nucléaire .....	20
6. Les antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones .....	20
6.1 Définition et caractéristiques générales .....	20
6.2 Propriétés physico-chimiques et spectroscopiques des dithiopyrrolones .....	21

## **CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODE**

### **I. Matériel**

#### **I. Microorganismes**

1. Souche d'actinobactérie SA 233 .....	24
2. Souches de microorganismes-cibles .....	24

### **II. Méthodes**

#### **I.- Etude taxonomique de la souche d'actinobactérie SA 233**

1. Etude morphologique .....	24
1.1 Macromorphologie .....	24
1.2 Micromorphologie .....	25
2. Etude chimiotaxonomique .....	25
3. Etude physiologique .....	25
4. Etude moléculaire .....	26

#### **II. Etude des antibiotiques de la souche SA 233**

1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieux solides .....	26
2. Production des antibiotiques en milieux liquides .....	26
2.1 Cinétique de production des antibiotiques en fonction des acides organiques et des acides aminés ajoutés au milieu de culture .....	27
2.2 Production d'antibiotiques en grande quantité .....	29
2.3 Extraction des antibiotiques et antibiographie .....	29
3. Analyse des extraits par HPLC analytique .....	30
4. Semi-purification des dithiopyrrolones .....	32
5. Purification finale des antibiotiques par HPLC .....	33

6. Etudes spectroscopiques des antibiotiques .....	33
6.1 Spectroscopie UV-visible .....	33
6.2 Spectroscopie Infra-Rouge .....	34
6.3 Spectrométrie de masse (par impact électronique direct) .....	34
6.4 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	34
7. Détermination des concentrations minimales d'inhibition des antibiotiques .....	35

## **CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION**

### **I. Résultats**

#### **I. Etude taxonomique de l'isolat d'actinobactérie SA 233**

1. Détermination du genre .....	36
1.1 Caractéristiques morphologiques .....	36
1.2 Analyse chimique des constituants cellulaires .....	37
1.3 Identification du genre .....	37
2. Détermination de l'espèce .....	37
2.1 Etude physiologique .....	37
2.2 Etude moléculaire .....	38
2.2.1 Séquençage de l'ADNr 16S .....	38
2.2.2 Hybridation ADN-ADN .....	38

#### **II. Etude des antibiotiques produits par *Saccharothrix* SA 233**

1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieux solides .....	39
2. Cinétique de production des antibiotiques de <i>Saccharothrix</i> sp. SA 233 sur milieu semi-synthétique en fonction des acides organiques et des acides aminés .....	41
2.1 Evolution de la biomasse .....	41
2.2 Evolution du pH .....	41
2.3 Evolution de l'activité antimicrobienne .....	41
3. Analyse des extraits par HPLC analytique .....	43
4. Semi-purification des dithiopyrrolones .....	44
5. Purification des molécules bioactives produites dans le milieu témoin et celles induites par l'ajout des acides organiques et aminés .....	45
6. Etudes spectroscopiques des molécules bioactives produites dans le milieu témoin et celles induites par l'ajout des acides organiques et aminés .....	45
6.1 Spectres dans l'UV-visible .....	45

6.2 Spectres de masse .....	46
6.3 Spectres RMN .....	46
7. Détermination des structures chimiques des antibiotiques .....	48
7.1 Antibiotiques produits dans le milieu témoin .....	48
7.2 Antibiotiques induits après addition de précurseurs .....	49
8. Détermination des concentrations minimales d'inhibition des antibiotiques (CMI) .....	50
<b>II. Discussion .....</b>	<b>51</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>54</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>55</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>66</b>

## Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

DAP : Acide diaminopimélique

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

IR : Infrarouge

MA : Mycélium aérien

MS : Mycélium du substrat

MS : Masse

PC : Phosphatidylcholine

PCR : Polymerase Chain Reaction

PG : Phospholipides glucosamine

PE : Phosphatidyléthanolamine

PGI : Phosphatidylglycérol NRRL : Northern Regional Research Laboratory, USA

SS : Semi-synthétique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

UV-V : Ultra-violet visible

## Index des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Différents chimiotypes et composition en acides aminés et en sucres des actinobactéries .....	6
<b>Tableau 2.</b> Profils phospholipidiques chez les actinobactéries .....	7
<b>Tableau 3.</b> Liste des espèces du genre <i>Saccharothrix</i> .....	12
<b>Tableau 4.</b> Principales substances ayant une activité biologique et synthétisées par les souches appartenant au genre <i>Saccharothrix</i> .....	13
<b>Tableau 5.</b> Données physico-chimiques et spectroscopiques de dithiopyrrolones .....	23
<b>Tableau 6.</b> Pourcentage de similarité des espèces de <i>Saccharothrix</i> par rapport à la souche SA 233 .....	38
<b>Tableau 7.</b> Action antibiotique de la souche SA 233 contre les bactéries et les champignons sur milieu ISP2 .....	40
<b>Tableau 8.</b> Longueurs d'ondes maximales d'absorption en UV-visible et masses des dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin et après induction par l'addition d'acides organiques et d'acides aminés chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	46
<b>Tableau 9.</b> Données de la RMN du 1H des composés AJ0 (t, v, s et c), PR2, PR3, PR4, PR5, PR7, PR8, PR9, PR10, PR11 et Cyst1 .....	47
<b>Tableau 10.</b> Données de la RMN du 13C des composés PR3, PR4, PR5 et PR7.....	48
<b>Tableau 11.</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des dithiopyrrolones pures sécrétées par <i>Saccharothrix algeriensis</i> dans le milieu SS après l'addition de précurseurs, vis-à-vis de divers microorganismes-cibles .....	50

## Index des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma représentatif du cycle de vie des actinobactéries mycéliennes sporulantes..	4
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique de la micromorphologie de quelques genres d'actinobactéries .....	5
<b>Figure 3.</b> Comparaison de la micromorphologie du genre <i>Saccharothrix</i> avec celle du genre d'actinobactéries le plus abondant dans la nature, <i>Streptomyces</i> .....	11
<b>Figure 4.</b> Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques .....	19
<b>Figure 5.</b> Structure générale des dithiopyrrolones. R2=H (Holothine), R2=CH3 (Pyrrothine). R1 est variable selon les différents dérivés des dithiopyrrolones .....	21

<b>Figure 6.</b> Schéma du protocole réalisé lors des cinétiques de production des antibiotiques sur milieux SS (sans et avec précurseurs), et mesure du poids sec et du pH .....	28
<b>Figure 7.</b> Schéma représentatif de la méthode de diffusion des puits .....	29
<b>Figure 8.</b> Schéma d'extraction et de mise en évidence des activités antimicrobiennes .....	31
<b>Figure 9.</b> Schéma représentatif de la méthode des disques de papier .....	32
<b>Figure 10.</b> Isolat SA 233 vu au microscope électronique à balayage. La barre indique l'échelle .....	36
<b>Figure 11.</b> Action antibiotique de la souche SA 233 contre <i>F.o. albedinis</i> (1) et <i>F.o. lini</i> (2) par la méthode des stries croisées .....	39
<b>Figure 12.</b> Evolution de la biomasse et du pH sur milieu SS au cours de la culture de <i>Saccharothrix sp.</i> SA 233 dans le milieu témoin (sans acides) et après ajout d'acides organiques (a) et d'acides aminés (b) .....	42
<b>Figure 13.</b> Cinétique des activités antibactériennes et antifongiques sur milieu SS témoin et après ajout des acides organiques et aminés chez <i>Saccharothrix sp.</i> SA 233. Bs: <i>B. subtilis</i> , Mr: <i>Mucor ramannianus</i> .....	43
<b>Figure 14.</b> Profil d'élution en HPLC analytique (longueur d'onde $\lambda = 390$ nm) montrant la présence des molécules bioactives synthétisées par <i>Saccharothrix sp.</i> SA 233 dans le milieu SS témoin sans précurseurs et après addition des acides organiques et aminés comme précurseurs .....	44
<b>Figure 15.</b> Semi-purification des bandes actives AJ et PS de <i>Saccharothrix sp.</i> SA 233 sur plaques épaisses de gel de silice .....	45
<b>Figure 16.</b> Squelette de base des dithiopyrrolones .....	48
<b>Figure 17.</b> Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthétisés par <i>Saccharothrix sp.</i> SA 233 dans le milieu témoin .....	49
<b>Figure 18.</b> Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthétisés par <i>Saccharothrix algeriensis</i> après l'ajout de précurseurs .....	49

## Résumé

Un isolat d'actinobactérie nommé SA 233 et provenant d'un échantillon de sol de la palmeraie d'Adrar a fait l'objet d'une étude taxonomique et de ses antibiotiques.

Les caractéristiques morphologiques et chimiques de cet isolat ont permis de le rattacher au genre *Saccharothrix*. Les caractéristiques physiologiques l'ont rapproché de *Saccharothrix australiensis*, avec cependant certaines différences. La comparaison de la séquence de l'ADNr 16 S de l'actinobactérie SA 233 avec celle des autres espèces du même genre, a donné des pourcentages de similitude de 97,5 % à 98,8 %, le plus élevé étant celui obtenu avec *Sa. australiensis*. Cependant, le test d'hybridation ADN-ADN avec *Sa. australiensis* a donné un pourcentage de similarité de 55,9 % seulement, ce qui montre que SA 233 appartient à une nouvelle espèce laquelle a été nommée *Saccharothrix algeriensis* (numéro d'accèsion NRRL B- 24137 et DSM 44581).

La souche SA 233 a montré des propriétés antibiotiques intéressantes contre plusieurs microorganismes pathogènes. En milieu liquide, la production quantitative et qualitative des antibiotiques est sous l'influence des milieux de culture. Le milieu semi-synthétique (SS) à base d'extrait de levure et de glucose s'est révélé être meilleur que d'autres milieux. Les antibiotiques produits sur milieu SS ont été extraits par du dichlorométhane et purifiés par chromatographie préparative sur plaques de gel de silice G60 et par HPLC en phase inverse sur colonne C18. *Saccharothrix algeriensis* SA 233 produit 5 antibiotiques non polyéniques. Les analyses spectroscopiques, particulièrement la spectrométrie de masse à haute résolution et les RMN du proton et du carbone 13 ont permis d'aboutir à leur structure chimique. Elles appartiennent toutes à la classe des dithiopyrrolones, antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote et du soufre. Ces molécules possèdent le même squelette de base, avec deux cycles accolés de type dithiopyrrole amidifié par différents acides organiques. L'étude de l'effet des acides organiques et aminés (précurseurs) sur la production d'antibiotiques par la souche SA 233 sur milieu SS, a donné des résultats intéressants. Ainsi, dix nouveaux dérivés ont été purifiés et caractérisés après addition des acides valérique, sorbique, cinnamique et l'acide aminé cystine.

Le spectre d'action de ces molécules s'étend sur plusieurs champignons phytopathogènes, levures et bactéries pathogènes pour l'homme, comme l'ont montré les tests d'antagonisme et la détermination des concentrations minimales inhibitrices.

**Mots clés :** *Saccharothrix algeriensis*, taxonomie, dithiopyrrolones, milieu semi-synthétique, précurseurs.

## Abstract

An actinobacterium named SA 233, isolated from a soil of the Adrar palm grove has, been the subject of a taxonomic study and its antibiotics.

The morphological and chemical characteristics of this isolate, attached it to the genus *Saccharothrix*. Physiological characteristics have compared it to *Saccharothrix australiensis*, with some differences. Comparison of the 16 S rDNA sequence of actinobacterium SA 233 with that of other species of the same genus, gave percentages of similarity from 97.5% to 98.8%, the highest being that obtained with *Sa. australiensis*. However, the DNA-DNA hybridization test with *Sa. australiensis* gave a percentage similarity of only 55.9%, which shows that SA 233 belongs to a new species which has been named *Saccharothrix algeriensis* (accession number NRRL B-24137 and DSM 44581).

The SA 233 strain has shown interesting antibiotic properties against several pathogenic microorganisms. In liquid media, the quantitative and qualitative production of antibiotics is under the influence of culture media. The semi-synthetic medium (SS) made from yeast extract and glucose has been shown to be better than other media. The antibiotics produced on SS medium were extracted with dichloromethane and purified by preparative chromatography on G60 silica gel plates and by reverse phase HPLC on a C18 column. *Saccharothrix algeriensis* SA 233 produces 5 non-polyene antibiotics. Spectroscopic analyzes, particularly high-resolution mass spectrometry and proton and carbon-13 NMRs, allowed their chemical structure to be determined. They all belong to the class of dithiolopyrrolones, heterocyclic antibiotics containing nitrogen and sulfur. These molecules have the same basic skeleton, with two adjacent cycles of the dithiolopyrrole type amidated by different organic acids. The study of the effect of organic and amino acids (precursors) on the production of antibiotics by strain SA 233 on SS medium has given interesting results. Thus, ten new derivatives were purified and characterized after addition of valeric, sorbic, cinnamic acids and the amino acid cystine.

The spectrum of action of these molecules extends over several phytopathogenic fungi, yeasts and bacteria pathogenic to humans, as shown by antagonism tests and the determination of minimum inhibitory concentrations.

**Keywords:** *Saccharothrix algeriensis*, taxonomy, dithiolopyrrolones, semisynthetic medium, precursors.

## الملخص

تم عزل البكتيريا الشعاعية المسماة SA 233 من عينة تربة مأخوذة من نخيل أدرار لدراسة الناحية التصنيفية ودراسة المضادات الحيوية الخاصة بها.

بينت الخصائص المورفولوجية والكيميائية لهذه العزلة أنه من الممكن ربطها بجنس *Saccharothrix*، كما سمحت الخصائص الفزيولوجية بربطها بـ *Saccharothrix australiensis*، مع وجود بعض الاختلافات.

أعطت مقارنة تسلسل ADNr 16S لـ SA 233 مع الأنواع الأخرى من نفس الجنس نسب تشابه تتراوح من 97.5% إلى 98.8%، أعلى نسبة تم الحصول عليها باستخدام *Sa. australiensis* ومع ذلك، فإن اختبار تهجين-ADN مع *Sa. australiensis* أعطى نسبة تشابه 55.9% فقط، مما يدل على أن SA 233 ينتمي إلى نوع جديد تم تسميته (*Saccharothrix algeriensis*)، وأعطى لها رقم الانضمام NRRL B-24137 و DSM 44581.

أظهرت سلالة SA 233 خصائص مثيرة للاهتمام من المضادات الحيوية ضد العديد من الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض. في الوسائط السائلة، يكون الإنتاج الكمي والنوعي للمضادات الحيوية تحت تأثير الوسائط الغذائية. تبين أن الوسط شبه مركب Milieu semi-synthétique (SS) المصنوع من خلاصة الخميرة والجلوكوز أفضل من الوسائط الأخرى.

تم استخلاص المضادات الحيوية المنتجة على وسط شبه مركب مع ثنائي كلورو ميثان Dichlorométhane وتنقيته بواسطة Chromatographie préparative على ألواح هلام السيليكا G60 وبواسطة HPLC. أنتجت سلالة *Saccharothrix algeriensis* SA 233 خمسة مضادات حيوية غير بوليبيدية.

سمحت التحليلات الطيفية Analyses spectroscopiques، وخاصة قياس الطيف الكتلي عالي الدقة والرنين المغناطيسي (RMN) للكربون C13 والبروتون، بتحديد تركيبها الكيميائي. جميعهم ينتمون إلى عائلة dithiopyrrolones، المضادات الحيوية الحلقية غير المتجانسة التي تحتوي على الأزوت والكبريت. تحتوي هذه الجزيئات على نفس الهيكل الأساسي، مع حلقتين متجاورتين من نوع dithiopyrrole، ترتبط معها أحماض عضوية مختلفة.

بينت دراسة تأثير الأحماض العضوية والأمينية على إنتاج المضادات الحيوية بواسطة سلالة SA 233 على وسط شبه مركب (SS) نتائج هامة. وقد تمت تنقية وتمييز عشرة مشتقات جديدة للـ dithiopyrrolones بعد إضافة الأحماض العضوية (acide valérique, acide sorbique et acide cinnamique) و الحمض الأميني cystine أثبتت الدراسة التضادية وتحديد التراكيز الدنيا المثبطة فعالية هذه الجزيئات ضد العديد من الفطريات الممرضة للنبات، والخمائر والبكتيريا الممرضة للإنسان.

الكلمات المفتاحية: *Saccharothrix algeriensis*، التصنيف، ثنائي كلور البيروول، وسط شبه مركب، البادئات.

### Introduction générale

La taxonomie bactérienne, définie comme étant l'étude des relations qui existent entre les bactéries, englobe leur classification, leur nomenclature et leur identification. Ces trois parties consistent à établir des taxons, groupes bactériens présentant des caractères communs, qui devront être nommés et identifiés sur la base de critères définis (**Prescott et al., 2013**). Cette classification des microorganismes est une discipline majeure qui permet de rendre intelligible l'immense diversité de ces derniers, tout en suivant des procédures « systématiques » pour leur identification et leur nomenclature. Une identification et une nomenclature fiables et actualisées sont indispensables aux microbiologistes pour établir la phylogénie des microorganismes. Il est donc impératif d'adapter les outils et les méthodes de classification aux méthodes d'identification. À l'heure actuelle, des outils moléculaires sont utilisés en complément aux méthodes phénotypiques pour identifier chaque microorganisme. Cette approche mixte devra s'appuyer sur une taxonomie qui tient compte des caractères phénotypiques et moléculaires, appelée taxonomie mixte et consensuelle ou taxonomie polyphasique (**Euzéby, 2001**).

Ces études taxonomiques ont affirmé que les sols sahariens, particulièrement ceux des palmeraies algériennes sont révélés être très diversifiés en genres d'actinobactéries. Ces microorganismes sont la source de nombreuses substances, notamment, les antibiotiques antibactériens et antifongiques, les antiviraux, les antitumoraux, les antiparasitaires, les immunosuppresseurs, aussi que de nombreux métabolites secondaires bioactifs. (**Strohl et al., 2001; Zitouni et al., 2004b; Berdy, 2005; Boubetra, 2015; Bouznada, 2017, Tata, 2019**); y compris ceux connus pourtant pour être rares ou peu fréquents dans le monde. Plusieurs souches isolées diffèrent morphologiquement et physiologiquement des espèces connues (**Sabaou et al., 1998**). Parmi ces souches, la souche d'actinobactérie SA233, a retenu l'attention par sa forte activité antibactérienne et antifongique. Cette souche d'actinobactérie isolée par Boudjella (**1994**), a été déterminée par la suite comme étant une nouvelle espèce, nommée *Saccharothrix algeriensis* (**Zitouni et al., 2004a**), laquelle a été déposée dans deux collections mondiales, NRRL et DSM, sous les numéros d'accès NRRL B-24137 et DSM 44581. *Sa. algeriensis* produit dans un milieu de culture semi-synthétique 5 molécules d'antibiotiques appartenant au groupe des dithiopyrrolones. Elle possède une grande capacité de produire d'autres dérivés de dithiopyrrolones, selon la nature et la concentration des précurseurs additionnés au milieu de culture (**Bouras et al., 2008; Merrouche et al., 2019, 2020**). Les dithiopyrrolones possèdent un spectre d'action large, avec une activité

## Introduction générale

---

antibactérienne et antifongique assez puissante *in vitro*, touchant plusieurs bactéries à Gram positif, des champignons filamenteux (phytopathogènes et toxigènes) et des levures (Lamari, 2006; Merrouche, 2012).

L'objectif de notre travail est de faire une synthèse sur l'ensemble des travaux réalisés sur l'actinobactérie *Sa. algeriensis*, en particulier, sur le plan taxonomique et l'étude des de la production de ses antibiotiques.

Ce mémoire est présenté en trois chapitres :

Dans le premier chapitre, nous avons fait un rappel bibliographique concernant les actinobactéries, en particulier, le genre *saccharothrix* du point de vue de leur taxonomie et de leur importance dans différents domaines. Un petit rappel est donné également sur les antibiotiques en générale et les dithiolopyrrolones en particulier : leur production, leurs caractéristiques générales et leurs propriétés physico-chimiques.

Le deuxième chapitre est consacré aux matériels et méthodes utilisées pour effectuer la caractérisation polyphasiques de cette souche d'actinobactérie et pour l'étude de la production de ses antibiotiques.

Le troisième chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus pour la taxonomie de la souche SA233 et la production des antibiotiques.

# **Chapitre 1**

## **Synthèse bibliographique**

### I. Les actinobactéries

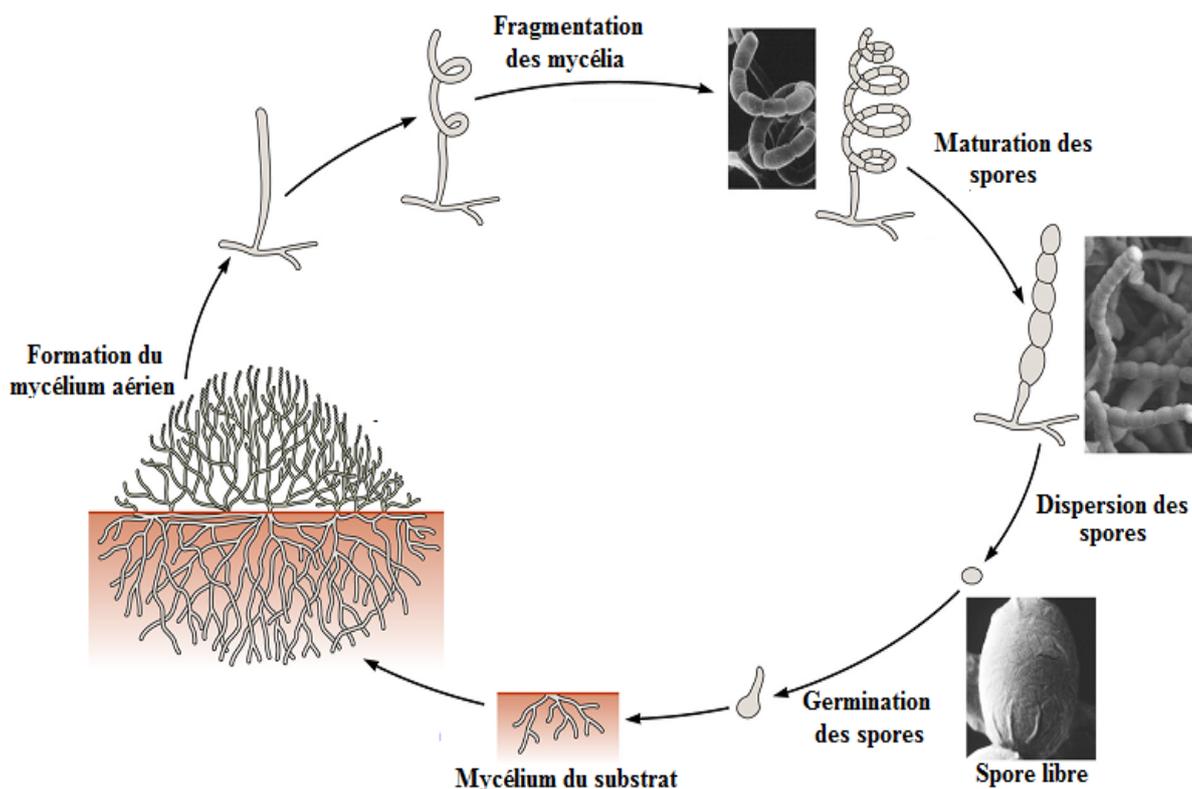
#### 1. Définition et caractéristiques générales des actinobactéries

Le phylum Actinobacteria est défini comme rassemblant les bactéries à Gram positif possédant un pourcentage guanine+ cytosine supérieur ou égale 55%, le plus souvent compris entre 60 et 75% (**Bergey's Manual, 2012**).

Traditionnellement, les actinobactéries étaient considérées comme des formes de transition entre les champignons et les bactéries, mais sont maintenant reconnues comme des organismes procaryotes. En effet, de nombreuses actinobactéries produisent un mycélium et se reproduisent par sporulation dont la germination assure le démarrage d'un nouveau cycle de vie (Figure 1) (**Amin et al., 2020; Ait Barka et al., 2016**).

Du point de vue morphologique, les espèces d'actinobactéries sont d'une remarquable variabilité. Elles comprennent à la fois celles dont le mycélium est rudimentaire, voire même inexistant, ayant ainsi la forme d'une cocci ou d'un bâtonnet (*Micrococcus*, *Mycobacterium*), celles se caractérisant par un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*), celles dont les hyphes se fragmentent totalement (*Rhodococcus*) ou partiellement (*Nocardia*), et enfin celles à mycélium développé, bien différencié et persistant, dont le diamètre des filaments varie entre 0,5 et 2  $\mu\text{m}$ , mais est généralement inférieur à 1  $\mu\text{m}$  (*Streptomyces*) (**Ludwing et al., 2012**). Parmi les formes mycéliennes, on distingue celles qui ne forment qu'un mycélium du substrat (MS) poussant à la surface et dans le milieu de culture et celles qui élaborent en plus un mycélium aérien (MA) issu du MS. De plus, il existe une curiosité biologique représentée par le genre *Sporichthya*, qui produit seulement un MA dont les hyphes sont attachés au substrat par des cellules "crampons", d'où absence du MS (**Normand et Benson, 2012**).

Physiologiquement, les actinobactéries sont des microorganismes chimio-organotrophes hétérotrophes, aérobies strictes ou microaérophiles, parfois même anaérobies, dont plusieurs produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Ce sont généralement des microorganismes saprophytes (les streptomycètes en particulier) vivant dans le sol et passent la majorité de leur cycle de vie à l'état de spores semi-dormantes, mais il existe également des formes pathogènes (**Ait Barka et al., 2016**).



**Figure 1.** Schéma représentatif du cycle de vie des actinobactéries mycéliennes sporulantes (Ait Barka *et al.*, 2016).

## 2. Critère d'identification des actinobactéries

### 2.1 Les critères morphologiques

Depuis la découverte de la streptomycine en 1944 par Waksman (Jose et Jebakumar, 2013), le nombre d'actinobactéries isolées à partir du sol a augmenté. De nombreux microbiologistes se sont intéressés à la classification de ces microorganismes, notamment celle des espèces du genre *Streptomyces*. Les critères morphologiques sont les premiers utilisés, et continuent jusqu'à maintenant à être considérés comme un critère important pour orienter l'identification.

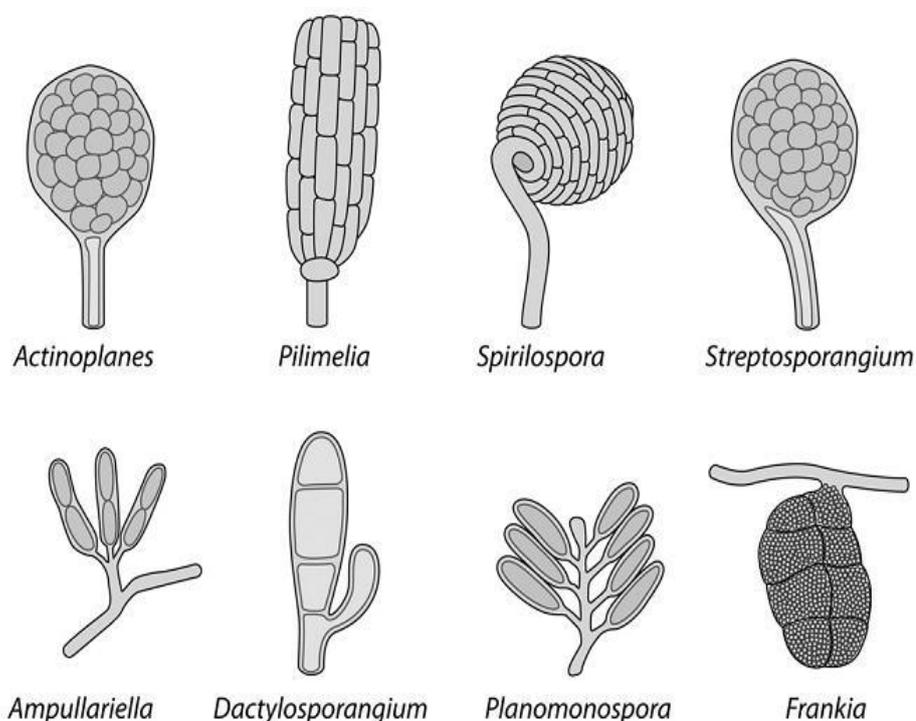
#### 2.1.1 Critères macromorphologiques

Les critères macromorphologiques sont observés à l'œil nu sur différents milieux de culture. Il s'agit de déterminer la présence ou non du mycélium aérien (MA) et/ou du mycélium du substrat (MS), la couleur du MA et du MS à l'aide d'une charte de couleur et la production ou non de pigments diffusibles dans le milieu de culture (Shirling et Gottlieb, 1966).

### 2.1.2. Critères micromorphologiques

La micromorphologie des actinobactéries est réalisée par l'observation au microscope optique, et parfois au microscope électronique. Il s'agit de déterminer, la fragmentation ou non du MA, la présence ou non de spores. La forme des spores, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes, leur surface et leur nombre et la formation ou non de structures spéciales (ex. synnemata) sont également notés (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Ces critères permettent souvent de classer une souche dans un genre, comme c'est le cas par exemple des genres *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc. (Figure 2).



**Figure 2.** Représentation schématique de la micromorphologie de quelques genres d'actinobactéries (**Ait Barka et al., 2016**).

### 2.2 Critères chimiques (chimiotaxonomie)

Même si dans certains cas il est possible de déterminer le genre selon les critères morphologiques, dans la plupart des cas, il est indispensable de considérer les critères chimiques. Chez les actinobactéries, la chimiotaxonomie consiste à déterminer la composition en acides aminés et en acides mycoliques pariétaux, en sucres dans les cellules entières, et en phospholipides, ménaquinones et acides gras membranaires (**Bergey's Manual, 2012**).

## Synthèse bibliographique

### 2.2.1 Composition pariétale en acides aminés

L'analyse des parois cellulaires des actinobactéries a montré qu'elles sont composées d'un glycopeptide contenant de la lysine chez les formes fermentatives, notamment le genre *Actinomyces* présent dans les cavités de l'Homme et des animaux (**Lechevalier et Lechevalier, 1985; Irina et al., 2001**), mais surtout de l'acide diaminopimélique (DAP) chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol et autres environnements. Les acides aminés importants du point de vue taxonomique sont le DAP qui peut être présent sous forme isomérique LL ou DL (mésos) et la glycine qui est variablement présente (**Lechevalier et Lechevalier, 1970; Amin et al., 2020**).

### 2.2.2 Composition cellulaire en sucre

L'étude de la composition en sucres des hydrolysats cellulaires a permis de déterminer cinq groupes utilisés comme des marqueurs pour la classification des actinobactéries, surtout celles qui possèdent l'isomère DL de DAP. Les nocardioformes (*Nocardia* et apparentés) sont des membres du premier groupe (A) caractérisé par la présence d'arabinose et de galactose. Le deuxième groupe (B) contient du madurose et est présent chez les maduromycètes (*Actinomadura* et apparentés). La présence de xylose et d'arabinose est caractéristique du quatrième groupe (D) retrouvé chez les actinoplanètes (ex. *Actinoplanes*, *Micromonospora*). Le cinquième groupe (E) est caractérisé par la présence de rhamnose et de galactose (ex. *Saccharothrix*). Quant au troisième groupe (C), ses représentants ne possèdent aucun sucre caractéristique, c'est-à-dire, absence des couples "arabinose-galactose", "xylose-arabinose" et "rhamnose-galactose" et absence également de madurose (**Ait Barka et al., 2016**). La combinaison du type pariétal d'acide aminé et du type glucidique permet un classement en groupes chimiques d'actinobactéries appelés chimiotypes (Tableau 1).

### 2.2.3 Compositions membranaire et pariétale en lipides

#### 2.2.3.1 Les phospholipides

Selon **Lechevalier et al. (1977)**, les phospholipides (lipides polaires) permettent de distinguer entre eux cinq groupes majeurs. Les profils phospholipidiques (PI à PV) sont résumés dans le Tableau 2.

**Tableau 1.** Différents chimiotypes et composition en acides aminés et en sucres des actinobactéries (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**).

Chimiotypes	Constituants cellulaires majeurs	Genres
I C	LL DAP + glycine, pas de sucre caractéristique	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardioides</i>
II D	DL DAP + glycine + arabinose + xylose	<i>Actinoplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i>
III B	DL DAP + madurose	<i>Streptosporangium</i> , <i>Planomonospora</i>

## Synthèse bibliographique

III C	DL DAP, pas de sucre caractéristique	<i>Nocardiosis, Thermomonospora</i>
III E	DL DAP + rhamnose + galactose	<i>Saccharothrix, Kutzneria</i>
IV A	DL DAP + arabinose + galactose	<i>Nocardia, Rhodococcus</i>
V	Ornithine + lysine	<i>Actinomyces</i>
VI	Lysine + acide aspartique et galactose (variablement présents)	<i>Oerskovia, Promicromonospora</i>
VII	Acide diaminobutyrique + glycine (lysine présente ou absente)	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
VIII	Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium</i>

**Tableau 2.** Profils phospholipidiques chez les actinobactéries (Lechevalier *et al.*, 1977).

Types de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemples
PI	-	-	-	V	<i>Actinomadura, Spirillospora</i>
PII	+	-	-	-	<i>Actinomadura, Spirillospora</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiosis, Pseudonocardia</i>
PVI	+	-	+	-	<i>Streptosporangium, Planomonospora</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia, Promicromonospora</i>
Types de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemples
PI	-	-	-	V	<i>Actinomadura, Spirillospora</i>
PII	+	-	-	-	<i>Actinomadura, Spirillospora</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiosis, Pseudonocardia</i>
PVI	+	-	+	-	<i>Streptosporangium, Planomonospora</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia, Promicromonospora</i>

Note: +: présent; -: absent; v: variable selon les genres et les espèces.

PE: phosphatidyléthanolamine; PC: phosphatidylcholine; PG: phospholipides contenant de la glucosamine; PGI: phosphatidylglycérol.

### 2.2.3.2 Les acides gras

Les acides gras membranaires chez les actinobactéries sont des chaînes qui varient entre de 02 à 90 atomes de carbone, mais seuls ceux de la gamme C10 à C24 ont une valeur taxonomique particulière (Suzuki *et al.*, 1994; Gago *et al.*, 2011).

Les ménaquinones sont des lipides membranaires classés en fonction du nombre d'unités isoprènes au niveau de la chaîne carbonée aliphatique et du nombre de doubles liaisons ou encore du degré de saturation. Ils ont un rôle important dans la chaîne de transport des électrons, et leur identification n'est obligatoire que lors de la description de nouvelles espèces (Wink *et al.*, 2017).

Les acides mycoliques sont des lipides présents au niveau de la paroi cellulaire de certaines actinobactéries ayant le chimiotype IVA tels que *Williamsia*, *Rhodococcus*, *Nocardia* et *Tsukamurella*. Le nombre d'atomes de carbone est compris entre 20 et 90, ce qui permet de différencier ces genres entre eux, comme par exemple les genres *Nocardia* (46-64 atomes de carbone), *Tsukamurella* (62-78 atomes de carbone) et *Williamsia* (50-56 atomes de carbone) (Manuel de Bergey, 2012).

### 2.3 Critères physiologiques

Les critères physiologiques sont très utilisés dans la taxonomie des actinobactéries, surtout avant l'application des méthodes moléculaires. Ils contribuent à la détermination des espèces appartenant au même genre, et reposent sur des tests portant sur la dégradation ou non de plusieurs composés organiques (sucres, acides aminés, lipides, etc.), la sensibilité ou non aux agents physiques et chimiques (pH, température, salinité, agents antimicrobiens), etc.

Au vu du nombre important de tests généralement effectués, les résultats deviennent difficilement exploitables. La taxonomie numérique basée sur ces tests a ainsi été créée. Elle avait visé à classer les souches dans des groupes homogènes appelés clusters (**Goodfellow *et al.*, 1990; Grund and Kroppenstedt, 1990**). Cependant, cette méthode n'est plus utilisée depuis l'évolution des critères moléculaires.

### 2.4. Critères moléculaires

La classification et la taxonomie des actinobactéries étaient principalement basées sur des critères phénotypiques, mais l'utilisation des outils moléculaires en taxonomie moderne est aujourd'hui incontournable et même obligatoire pour la proposition de nouveaux genres ou de nouvelles espèces. Les principales techniques moléculaires utilisées pour l'identification des actinobactéries sont l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, ainsi que le pourcentage de G+C, ce dernier n'étant obligatoire que lors de la création de nouveaux genres (**Goodfellow and Cross, 1984; Kieser *et al.*, 2000**).

Dans l'analyse des séquences de l'ADN ribosomique 16S, organisme, est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les séquences obtenues sont alors déterminées (séquençage) puis comparées avec des milliers de séquences d'espèces-types disponibles dans des bases de données génomiques. C'est une méthode rapide et efficace pour l'identification ou le rapprochement à des espèces (**Zhi *et al.*, 2009**).

L'hybridation ADN-ADN est également utilisée dans la classification des actinobactéries pour déterminer les espèces. En utilisant les ADN des souches de référence, le taux de réassociation ADN-ADN permet de décider si la souche analysée représente une nouvelle espèce ou non. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de réassociation de leurs brins d'ADN inférieur à 70 % (**Wayne *et al.*, 1987**).

Le pourcentage en guanine-cytosine (G+C) de l'ADN bactérien est important lors de la description de l'espèce-type d'un nouveau genre, ainsi que la reconnaissance des genres et des familles d'actinobactéries. Plus deux organismes sont proches, plus leur contenu en G + C est

similaire. Le % de G + C de la plupart des actinobactéries se répartit entre 50 et 80 % (Dhanasekaran et Jiang, 2016).

### 3. Distribution des actinobactéries

Les actinobactéries étaient largement considérées comme des bactéries du sol, mais sont maintenant reconnues comme étant cosmopolites. Elles sont répandues à l'échelle universelle dans presque tous les écosystèmes. Elles sont isolées également à partir d'environnements extrêmes (déserts chauds et froids, milieux aquatiques pollués, sédiments marins profonds, etc.).

La présence des actinobactéries est particulièrement fréquente dans le sol (Elbendary *et al.*, 2018; Chavan *et al.*, 2013). La densité de population des actinobactéries dépend de leur habitat et des conditions climatiques dominantes. Elles sont généralement présentes à des densités de l'ordre de  $10^6$  à  $10^9$  cellules par gramme de sol (Ait Barka *et al.*, 2016). Dans des sols sahariens d'Algérie, elles constituent entre 15 et 60 % de la microflore totale et parfois même jusqu'à 91 % dans les horizons situés entre 1 et 2 m et à plus de 2 m de profondeur, avec une prédominance des *Streptomyces* (Sabaou *et al.*, 1992).

Les actinobactéries sont largement réparties dans les habitats aquatiques, tels que les ruisseaux, les rivières, les lacs et les sédiments fluviaux (Makkar et Cross, 1982). Les souches, isolées des échantillons marins, étaient en grande partie d'origine terrestre mais, il existerait bien une flore actinobactérienne propre aux sédiments marins. Celle-ci est caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale relativement basse (Bouznada, 2018).

Les actinobactéries peuvent vivre à l'intérieur des tissus végétaux à l'état endophytes, comme elles sont également dominantes dans les sols rhizosphériques de plusieurs espèces végétales. Elles jouent des rôles importants comme agents de biocontrôle (lutte biologique) contre les maladies des plantes causées par les agents phytopathogènes et peuvent promouvoir la croissance des plantes hôtes (Passari *et al.*, 2018; Yadav *et al.*, 2018; Allali *et al.*, 2019).

### 4. Importance des actinobactéries

La diversité écologique assez exceptionnelles des actinobactéries et leur hétérogénéité métabolique font d'eux des producteurs potentiels de nombreuses molécules à propriétés très diverses et intéressantes dans les domaines médical, vétérinaire et agronomique (Abbas, 2006; Anandan *et al.*, 2016).

Les actinobactéries sont très utiles en biotechnologie, elles présentent la source de nombreux importants métabolites, qui peuvent être des antibiotiques, des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des antimétabolites, des antihistaminiques, des analgésiques, des vasodilatateurs, des immunostimulants et des immunosuppresseurs (Rawasheh *et al.*, 2005; Demain, 2006; Reis *et al.*, 2012; Yassien *et al.*, 2015). Les actinobactéries sont de remarquables producteurs d'antibiotiques, qui peuvent être des agents antibactériens, antifongiques ou antiviraux. Ils peuvent être aussi à propriétés anti-tumorales et cytostatiques (Harvey, 2008). Les *Streptomyces* sont particulièrement prolifiques (Ozbay *et al.*, 2004). Ainsi, 80% des antibiotiques d'origine microbienne commercialisés proviennent du genre *Streptomyces* (Thakur *et al.*, 2007).

Dans le domaine agronomique, les actinobactéries ont un rôle important dans les processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols. Ils peuvent dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, la chitine et les lignocelluloses des plantes (McKenna *et al.*, 2002; Manucharova *et al.*, 2006). Plusieurs expériences faites sur l'utilisation des actinobactéries dans la lutte biologique des maladies des plantes ont révélé des résultats prometteurs et ceux grâce aux propriétés antagonistes de ces bactéries (Yekkour *et al.*, 2015; Goudjal *et al.*, 2016; Toumatia *et al.*, 2016; Merrouche *et al.*, 2017; Laassami *et al.*, 2020).

## II. Le genre *Saccharothrix*

### 1. Caractéristiques et position taxonomique

Le genre *Saccharothrix* a été décrit pour la première fois par Labeda *et al.* (1984) comme espèce-type *Sa. australiensis* ATCC 31497. Dans la dernière édition du Manuel de Bergéy de 2012, ce genre est classé dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (ordre des *Pseudonocardiales*).

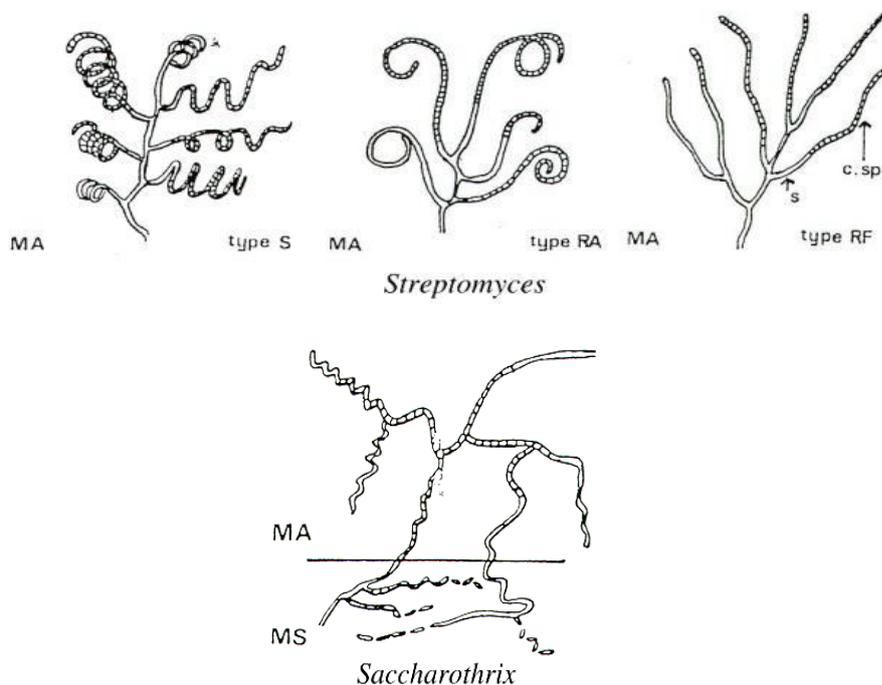
Les colonies de *Saccharothrix* portent en général un mycélium aérien, lequel peut être abondant ou très peu produit selon les espèces et les souches. Les filaments du mycélium aérien se fragmentent de manière anarchique, souvent en "zig-zag", aboutissant à la formation de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets (1 à 2 µm x 0,7 à 1 µm) et non mobiles. Il n'y a pas de production de sporophores comme chez les *Streptomyces*. Le mycélium du substrat se fragmente souvent en éléments coccoïdes ou allongés, cette fragmentation pouvant

être excessive ou, au contraire, assez réduite. Une comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre *Streptomyces* est illustrée dans la Figure 2.

Chimiquement, *Saccharothrix* est caractérisé par une paroi cellulaire de type IIIE (forme DL de l'acide diaminopimélique + rhamnose-galactose), par des phospholipides membranaires de type PII (présence de phosphatidyléthanolamine + hydroxyphosphatidyléthanolamine) ou bien PIV (phosphatidyléthanolamine + phospholipides contenant de la glucosamine), par des ménaquinones de type MK-9(H4) et MK-10(H4) et par des acides gras à chaînes droites monoinsaturées, iso et antéiso (**Labeda et Kroppenstedt, 2000; Labeda et al., 2001**).

### 2. Les espèces appartenant au genre *Saccharothrix*

Le genre de *Saccharothrix*, comprend actuellement 22 espèces décrites, dont une regroupe deux sous-espèces (Tableau 3). Parmi ces espèces, six ont été isolées et mises en évidence en Algérie, au niveau du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), à savoir : *Saccharothrix algeriensis* (**Zitouni et al., 2004a**), *Saa. hoggarensis*, *Sa. saharensis*, (**Boubetra et al., 2013**) et *Sa. tamanrassetensis* (**Boubetra et al., 2015**), *Sa. isguenensis* (**Bouznada et al., 2016**) et *Sx. ghardaiensis* sp. nov. (**Bouznada et al., 2017**).



**Figure 3.** Comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre d'actinobactéries le plus abondant dans la nature, *Streptomyces* (**Sabaou, 1998**).

**Note:** MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, Rectus Flexibilis (chaînes de spores droites à flexueuse); RA, Retinaculum Apertum (chaînes en crochets ou en boucles fermées); S, Spira (chaînes spiralées); s, sporophore; c. sp., chaînes de spores.

## Synthèse bibliographique

**Tableau 3.** Liste des espèces du genre *Saccharothrix*.

Espèces	Souches-types	Références
<i>Sa. australiensis</i>	NRRL 11239T	(Labeda <i>et al.</i> , 1984)
<i>Sa. texasensis</i>	NRRL B-16107T	(Labeda et Lyons, 1989)
<i>Sa. espanaensis</i>	DSM 44229	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Sa. mutabilis</i> sub sp. <i>mutabilis</i>	DSM 43853T	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Sa. mutabilis</i> sub sp. <i>capreolus</i>	DSM 40225T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sa. coeruleofusca</i>	NRRL B-16115T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sa. longispora</i>	NRRL B-116116T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sa. syringae</i>	NRRL B-16468T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sa. algeriensis</i>	NRRL B-24137T	(Zitouni <i>et al.</i> , 2004a)
<i>Sa. xinjiangensis</i>	NBRC 101911T	(Hu <i>et al.</i> , 2004)
<i>Sa. violaceirubra</i>	NBRC 102064T	(Otoguro <i>et al.</i> , 2009)
<i>Sa. variisporea</i>	NRRL B-16296T	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
<i>Sa. yanglingensis</i>	KCTC 19722T	(Yan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Sa. saharensis</i>	DSM 45457T	(Boubetra <i>et al.</i> , 2013)
<i>Sa. hoggarensis</i>	DSM 45456T	(Boubetra <i>et al.</i> , 2013)
<i>Sa. carnea</i>	DSM 45878T	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Sa. tamanrassetensis</i>	DSM 45947T	(Boubetra <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sa. lopnurensis</i>	YIM LPA2hT	(Li <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sa. ecbatanensis</i>	DSM 45486T	(Mohammadipanah <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sa. stipae</i>	JCM 30560T	(Lin <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sa. isguenensis</i> sp. nov.	MB27T	(Bouznada <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sa. ghardaiensis</i> sp. nov.	MB46T	(Bouznada <i>et al.</i> , 2017)
<i>Sa. tharensis</i> sp. nov.	TD-093T	(Ibeyaima <i>et al.</i> , 2018)

### 3. Métabolites secondaire secrétés par le genre *Saccharothrix*

Les souches appartenant au genre *saccharothrix* secrètent une multitude d'antibiotiques de nature chimique assez diversifiée. Parmi les premiers antibiotiques décrits, nous citerons la nocamycine, sécrétée par une souche de *Sa. syringae* (Horvath *et al.*, 1979). On peut ainsi trouver, des polyamines ou des aminoglycosides (Takahashi *et al.*, 1986), des benzoquinones (Isshiki *et al.*, 1989), des alcaloïdes (Suzuki *et al.*, 1991), des glycopeptides (Takeuchi *et al.*, 1992), des nucléosides carbocycliques (Bush *et al.*, 1993), des composés phosphorés acides et hydrophiles (Kimura *et al.*, 1995), des dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002), des heptadécaglycosides (Singh *et al.*, 2000), des anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004) et des macrolides (Zitouni, 2005). La sacchathridine A, un dérivé naphtoquinonique agissant

## Synthèse bibliographique

comme inhibiteurs des prostaglandines, a été aussi isolée à partir d'une souche de *Saccharothrix* sp. (Nakae *et al.*, 2013).

Récemment, les études menées par Lahoum (2017) ont montré la production de plusieurs antibiotiques nouvellement décrits chez le genre *Saccharothrix* tels que la caerulomycine A, la caerulomycine F et la caerulomycinonitrile, ainsi que deux nouvelles molécules bioactives appartenant à la famille des cyanogrisides, nommées cyanogriside I et cyanogriside J.

Par ailleurs, les travaux cités précédemment rapportent que certains antibiotiques sécrétés par des souches de *Saccharothrix* spp., seraient doués d'une activité antibactérienne, comme la swalpamycine B, ou antifongique comme le thiazolylpyridine, ou encore antibactérienne et antifongique à la fois, comme les dithiopyrrolones. Enfin, certains autres composés sont doués d'activités antitumorales (ammocidine), antivirales (fluvirucines), herbicides (phosphonothrixine), ou inhibitrices de métalloprotéases ou d'autres enzymes (molécule WS75624) (Bouznada, 2018). Le tableau 4, donne les principales substances bioactives synthétisées par le genre *Saccharothrix*.

**Tableau 4.** Principales substances ayant une activité biologique et synthétisées par les souches appartenant au genre *Saccharothrix*.

Substances	Activité	Origine	Références
Nocamycine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. syringae</i>	Horvath <i>et al.</i> (1979).
Polymitoxine	Antibactérienne	<i>Sa. mutabilis</i>	Jain <i>et al.</i> (1982).
Dopsisamine	Antibactérienne, antifongique	<i>Sa. mutabilis</i>	Takahashi <i>et al.</i> (1986).
LL-C19004	Antibactérienne	<i>Sa. espanaensis</i>	Kirby <i>et al.</i> (1987).
Kinamycines (1 et 2)	Antibactérienne, antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isshiki <i>et al.</i> (1989).
Sekothrixide	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Seto <i>et al.</i> (1992).
Tetrazomine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. mutabilis</i>	Suzuki <i>et al.</i> (1991).
Fluvirucines (A1, A2, B1, B2, B3, B4 et B5)	Antivirale	<i>Sa. mutabilis</i>	Tomita <i>et al.</i> (1991).
Galacardines (A et B)	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Takeuchi <i>et al.</i> (1992).
Coformycine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Dancer <i>et al.</i> (1997).

## Synthèse bibliographique

WS75624 A et B	Inhibiteur d'enzyme, convertisseur de l'endothéline	<i>Saccharothrix</i> sp.	Yoshimura <i>et al.</i> (1995).
Phosphonothrixine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Takahashi <i>et al.</i> (1995). Nakamura <i>et al.</i> (1999).
Thiazolylpyridine	Antifongique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Sugawara <i>et al.</i> (1999).
TMC 96	Inhibiteur de protéasome	<i>Saccharothrix</i> sp.	Koguchi <i>et al.</i> (1999).
Ammocidine	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Murakami <i>et al.</i> (2001).
Pluraflavines (A, B et E)	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Vértesy <i>et al.</i> (2001).
Saccharomicines (A et B)	Antibactérienne	<i>Sa. espanaensis</i>	Wang <i>et al.</i> (2001).
Dithiopyrrolones (AJ, C1, C2, A, D et F)	Antibactérienne, antifongique	<i>Sa. algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> (2002a,b).
Pravastatine	Anti-cholestérolémique	<i>Sa. mutabilis</i>	Matsuo <i>et al.</i> (2003).
(GBC33-O)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u. (Brevets)
(FZO32-W)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u. (Brevets)
(GBC32-N)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u. (Brevets)
Kinamycine G	Antibactérienne, antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Ito <i>et al.</i> (1970).
RUG 13A	Analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Yamatodami <i>et al.</i> (1970).
RUG 13B	Analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Yamatodami <i>et al.</i> (1970).
(GYZ60-K)	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isono (1988).
(GYZ61-L)	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isono (1988).
Swalpamycine B	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni (2005).
Aldgamycine G	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni (2005).
mutactimycine C	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Li <i>et al.</i> (1992).
mutactimycine PR	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni <i>et al.</i> (2004a,b).

### III. Les antibiotiques

#### 1. Généralités

Les grands progrès réalisés dans le domaine de la chimiothérapie anti-infectieuse, depuis l'âge de la pénicilline et des sulfamides jusqu'à celui des céphalosporines et des nouvelles quinolones, permet actuellement aux médecins de lutter, d'une façon efficace, contre la plupart des agents infectieux. De nos jours, plusieurs antibiotiques sont connus mais leur utilisation croissante tend à entraîner des cas de résistance parfois alarmants, ce qui a exigé la poursuite des recherches dans ce domaine. À l'heure actuelle, des milliers d'antibiotiques sont découverts, dont seulement 2% sont utilisés dans les domaines médical, vétérinaire, agro-alimentaire et agricole (**Thiele-Bruhn, 2003; Solecka et al., 2012**).

#### 2. Production des antibiotiques

La production des antibiotiques se produit généralement pendant la phase de croissance tardive du microorganisme producteur ou durant l'iodiophase. Ce processus de production de métabolites secondaires dépend fortement de la croissance du microorganisme et des paramètres nutritionnels (**Bouras et al. 2008; Jose et al., 2013; Kavitha et Savithri, 2017**). La nature des antibiotiques produits par les actinobactéries dépend de l'espèce, de la souche et des conditions de culture telles que l'inoculum, le pH, le temps d'incubation, et la nature des sources de carbone et d'azote (**Bouras et al., 2008; Amin et al., 2020**).

#### 3. Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques

##### 3.1 Effet nutritionnel

##### 3.1.1 Effet de la source de carbone

La source de carbone est un des facteurs nutritionnels les plus importants qui influence le métabolisme des microorganismes. Elle constitue généralement la majeure partie d'un milieu de culture, ce qui en fait l'objet de nombreuses études sur l'optimisation de la production d'antibiotiques (**Bouras 2005; Strub, 2008; Merrouche, 2012**).

Plusieurs auteurs ont constaté que la production des molécules actives est étroitement liée à la nature et à la concentration de la source de carbone (**Bouras et al., 2008; Thakur et al., 2009; Singh et Rai, 2012; Souagui et al., 2015**). Toutefois, certains substrats carbonés peuvent exercer un effet négatif sur la production. En effet, pour la plupart des microorganismes producteurs, une source de carbone rapidement assimilable comme le

glucose, le glycérol, et même le citrate, peut exercer une action négative sur la production (Singh & Rai, 2012; Souagui *et al.*, 2015).

### 3.1.2 Effet de la source d'azote

Comme pour le carbone, le choix de la source d'azote et de sa concentration dans le milieu joue également un rôle crucial dans la synthèse des antibiotiques, et elle est à bien des égards un facteur plus important que d'autres nutriments pour la croissance cellulaire et la production de métabolites secondaires. Ainsi, l'utilisation d'acides aminés spécifiques peut augmenter la productivité dans certains cas et inversement, des acides aminés inappropriés peuvent inhiber la synthèse de métabolites (Marwick *et al.*, 1999 ; Bouras *et al.* 2006a, b).

Plusieurs auteurs rapportent par ailleurs que des sources d'azote telles que le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le chlorure d'ammonium, la peptone, la farine soja, la farine d'haricot et l'extrait de levure ont une grande influence sur la production d'antimicrobiens par les actinobactéries (Bouras, 2005; Taurino *et al.*, 2011; Abdelwahed *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).

### 3.1.3 Effet d'autres sources

La biosynthèse de nombreux antibiotiques est très sensible à la présence de phosphore et dont la source préférée est le phosphate inorganique (Pi). Il a été rapporté que des concentrations élevées de phosphate, inhibaient la production de métabolites secondaires tout en favorisant la croissance des microorganismes (Bibb, 2005).

Plusieurs travaux ont démontré l'implication d'autres nutriments dans le processus du métabolisme secondaire. Il s'agit des éléments minéraux comme le phosphore, le magnésium et le potassium, ainsi que les oligoéléments, essentiellement Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo et Mn. De faibles concentrations de ces éléments stimulent la croissance et la production des antibiotiques (Mellouli *et al.*, 2003; Strub *et al.*, 2008).

## 3.2 Facteurs physico-chimiques et environnementaux

Les conditions de culture comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation, affectent également la production des antibiotiques. Le pH joue un rôle essentiel dans la production des antibiotiques. Une faible variation de pH peut avoir des effets marqués sur la productivité d'une souche. D'une manière générale, la production est optimale à pH légèrement basique (Oskay, 2011). Les températures optimales permettant une synthèse d'antibiotiques sont généralement plus basses que celles permettant la croissance. Elles sont situées dans des zones souvent étroites (Wang *et al.*, 2010). L'agitation agit sur la morphologie de la souche, sur la croissance et sur la production d'antibiotiques. En effet, l'agitation affecte la morphologie du microorganisme, l'aération et le mélange des éléments

nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires (Wadetwar *et al.*, 2013; van Dissel & van Wezel, 2017).

### 3.3 L'inoculum

L'inoculum représente l'ensemble de la biomasse (spores, cellules, hyphes) nécessaire pour ensemercer un milieu de culture de production de métabolites secondaires (Delaunay *et al.*, 2003). Par ailleurs, le succès de toute production biotechnologique est étroitement relié à la qualité et à la quantité de l'inoculum de départ, de ce fait afin d'en garantir le succès, il convient d'assurer sa pureté et sa stabilité (Larpen et Sanglier, 1989; Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992).

### 4. Purification des antibiotiques

Les méthodes de purification dépendent des caractéristiques de la molécule à déterminer et de sa concentration dans le milieu de fermentation. Tout au long du processus de purification, il est important d'effectuer des contrôles microbiologiques (bioautographie et antibiographie). Les techniques de séparation sont souvent accompagnées de tests de révélations chimiques (chromogéniques), spectroscopiques (UV-visible, infrarouge) pour la détection des antibiotiques ainsi que pour avoir des informations sur leur nature (Merrouche, 2012; Bouznada, 2018).

L'extraction (première étape) élimine la plus grande partie des constituants du milieu de fermentation. C'est souvent une extraction liquide-liquide avec utilisation des solvants organiques de polarités différentes. Les différents extraits organiques et aqueux sont testés afin de déterminer le solvant approprié pour les extractions ultérieures (Lahoum, 20017).

Les étapes suivantes nécessitent des méthodes de purification plus fines adaptées à de petites quantités de produit. Il s'agit de la chromatographie sur papier (CP), sur couche mince (CCM), sur colonne à basse pression ou encore à haute pression. Cette dernière ou chromatographie liquide à haute pression (HPLC), est une technique rapide et efficace permettant d'aboutir à la purification totale des antibiotiques. Elle est particulièrement utilisée pour séparer des complexes d'antibiotiques (Merrouche, 2012).

### 5. Détermination des structures chimiques des antibiotiques

La caractérisation des structures chimiques des antibiotiques est le résultat de combinaison de plusieurs données obtenues par différentes analyses, principalement spectroscopiques, chimiques, physicochimiques et chromatographiques.

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

La figure 4, illustre le protocole général de production, de purification et de caractérisation des antibiotiques.

### 5.1 Spectroscopie UV-Visible

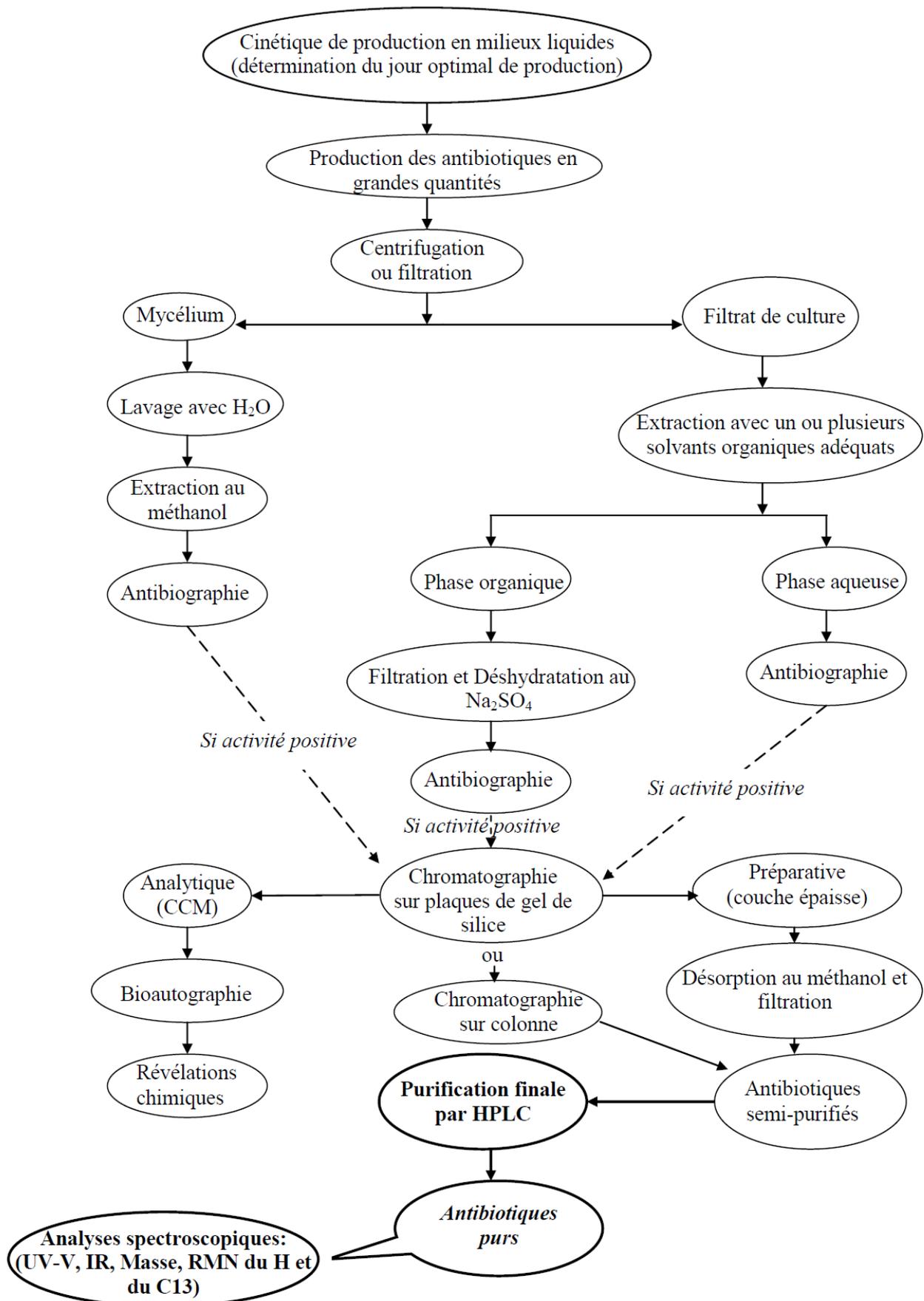
La spectroscopie UV-visible permet de détecter la présence de chromophores, de liaisons conjuguées et de certains groupements fonctionnels. Elle est très utile pour détecter les composés aromatiques et les systèmes insaturés et conjugués. C'est le cas des polyènes qui possèdent des spectres d'absorptions caractéristiques (**Martin, 1979; Chan et Aszalos, 1987**). Les mesures sont réalisées dans l'UV (190 à 400 nm) et/ou dans le visible (400 à 800 nm).

### 5.2 Spectroscopie Infra Rouge

La spectroscopie infrarouge détermine les groupements fonctionnels dont certains (NH<sub>2</sub>, OH, CO, etc.) possèdent une bande d'absorption caractéristique, quelle que soit la substance considérée. Les spectres obtenus sont comparés avec ceux déjà enregistrés dans les banques de données (**Rouessac, 1992**). La partie infrarouge du rayonnement électromagnétique est partagée en trois domaines : le proche infrarouge qui s'étend de 14 000 à 4000 cm<sup>-1</sup> (0,7-2,5 m en longueurs d'onde); l'infrarouge moyen qui va de 4000 à 400 cm<sup>-1</sup> (2,5-25 m) et enfin l'infrarouge lointain, qui couvre le domaine spectral de 400 à 10 cm<sup>-1</sup> (25-1000 m).

### 5.3 Spectrométrie de masse

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



**Figure 4.** Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques.

### 5.4 Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et celle du carbone 13 est une technique qui, en soumettant la molécule à un champ magnétique, permet d'analyser sa conformation et sa stéréochimie. Le spectre RMN se présente sous la forme de pics caractérisant les déplacements chimiques. Il existe des tables de corrélation qui aident à identifier chaque type de proton ou de carbone en fonction de son déplacement chimique (**Rouessac, 1992**).

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

## 6. Les antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones

### 6.1 Définition et caractéristiques générales

Les dithiopyrrolones sont des antibiotiques d'origine naturelle caractérisés par un noyau hétérocyclique de type 1,2-dithiolo-[4-3-b]-pyrrolo-5(4H)-one, aussi appelé pyrrolinodithiolo ou pyrroloisothiazole. La structure de ces dérivés est formée de deux cycles pentanoïques : un cycle pyrrole portant des radicaux liés aux azotes 4 et 7, et un cycle dithiolo (Qin *et al.*, 2013). Selon la nature du radical (R1) relié à l'azote en position 4 du cycle pyrrole, deux familles de dithiopyrrolones, d'origine biologique, sont distinguées : la famille des dérivés holothine (R1 = H) et celle des dérivés pyrrothine qui portent un groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>) (Figure 5) (**Stachel *et al.*, 2002**).

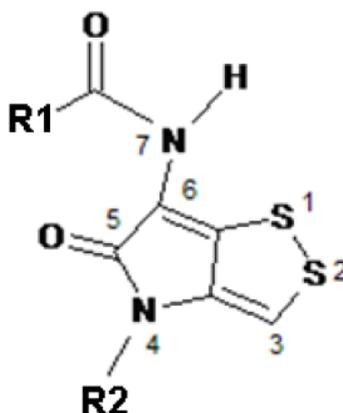
Ces antibiotiques possèdent une forte activité antimicrobienne, qui touche des bactéries à Gram positif et Gram négatif, des levures et des champignons filamenteux (**Celmer *et al.*, 1952**; **Lamari *et al.*, 2002a**; **Merrouche *et al.*, 2010, 2011, 2018, 2019 et 2020**).

De plus, cette classe d'antibiotique présente des activités protozoïcides, larvicides et insecticides (**Seneca *et al.*, 1952**; **Cole & Rolinson, 1972**; **McInerney *et al.*, 1991**). En outre, les dithiopyrrolones peuvent exercer une action anti-allergique et anti-cancéreuse, en particulier, contre les cellules cancéreuses du colon, du cerveau et du sein (**Stahl *et al.*, 1988**; **Webster *et al.*, 2000**). Enfin, les données toxicologiques disponibles sur les dithiopyrrolones, en particulier les deux dérivés, la thiolutine et l'holomyvine, limite leur usage dans le domaine médical (**Seneca *et al.*, 1952**; **Vondaehn *et al.*, 1969**), cependant leur utilisation dans le domaine agronomique est encouragée (**Gopalkrishnan et Jump, 1952** ; **Dell *et al.*, 1992**; **Meklat, 2004** ; **Merrouche *et al.*, 2017**).

## Synthèse bibliographique

Les dithiopyrrolones sont produits par voie biologique et chimique. Les microorganismes présentent la source des dithiopyrrolones naturelles, dont nous avons principalement les actinobactéries (ex. *Streptomyces albus*, *S. pimprina*, *S. kasugaensis*, *Saccharothrix algeriensis*, etc.), les bactéries (ex. *Xenorhabdus bovienii*, *X. luminescens* et *X. nematophilus* ou encore les bactéries marines (*Alteromonas rava*, *Photobacterium halotolerans* et *Pseudoalteromonas sp* SANK 73390 (Celmer et Solomons, 1955, Furumai *et al.*, 1982 McInerney *et al.*, 1991, Webster *et al.*, 2002 Murphy *et al.*, 2011).

Différents dérivés dithiopyrrolones sont synthétisés chimiquement. Les travaux de Hjelmgaard *et al.* (2007) fournissent ainsi une voie de synthèse en six étapes permettant de synthétiser plusieurs dithiopyrrolones (R1 H, R2 variable) grâce à l'acylation de l'intermédiaire holothine et à l'aide de chlorures d'acyle.



**Figure 5.** Structure générale des dithiopyrrolones.  
R2=H (Holothine), R2=CH<sub>3</sub> (Pyrrothine). R1 est variable selon les différents dérivés des dithiopyrrolones.

### 6.2 Propriétés physico-chimiques et spectroscopiques des dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones ont une couleur allant du jaune à l'orange, au vert et au noir, et ce grâce au noyau pyrrolinodithiolo et aux radicaux portés (R1 ou R2) (Schachtner *et al.*, 1999). Leur solubilité est généralement très bonne dans le chloroforme et le diméthylsulfoxyde, bonne dans le dichlorométhane et le méthanol, de moyenne à bonne dans l'acétate d'éthyle, le n-butanol, l'éthanol et l'acétone, le benzène et modérée dans l'eau et très faible dans le n-hexane et l'éther diéthylique (Qin *et al.*, 2013).

Les propriétés spectroscopiques des dithiopyrrolones sont caractéristiques (Tableau 5). Les spectres UV montrent deux maxima d'absorption caractéristiques à une longueur d'onde comprise entre 302 et 311 nm d'une part et entre 388 et 402 nm d'autre part. Leurs spectres infrarouges font apparaître plusieurs maxima d'absorption correspondants aux différents

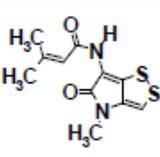
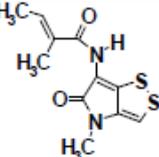
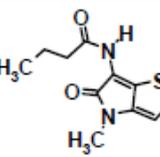
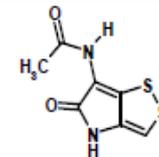
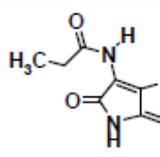
## Synthèse bibliographique

---

groupes fonctionnels des dithiopyrrolones c'est à dire deux liaisons amides et deux liaisons C=C. Un premier maximum d'absorption entre 1530-1553  $\text{cm}^{-1}$  correspond à une vibration en déformation des liaisons NH. Un deuxième maximum d'absorption entre 3205-3280  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration en élongation des liaisons NH. Deux bandes C=O sont visibles entre 1633-1661  $\text{cm}^{-1}$  et 1645-1680  $\text{cm}^{-1}$ . Par ailleurs une bande entre 1575-1600  $\text{cm}^{-1}$  traduit la présence de liaisons C=C. Enfin les spectres de masse des dithiopyrrolones obtenus par impact électronique présentent un pic caractéristique  $m/z=172$  ou 186 correspondant à la molécule après la perte du groupement acyl lié par une liaison amide à l'azote N°7. Ce fragment caractéristique correspond à la pyrrothine ( $m/z=186$ ) ou à l'holothine ( $m/z=172$ ) suivant la dithiopyrrolone considérée (**Chorin, 2009**).

## Synthèse bibliographique

**Tableau 5.** Données physico-chimiques et spectroscopiques de quelques dithiopyrrolones (**Chorin, 2009**).

	Thiolutine	Seneciopyrrothine	Tigloylpyrrothine	Butanoyl-pyrrothine	Holomycine	Propionyl-holothine
<b>Couleur</b>	Jaune	Jaune-Orange	Jaune-Orange	Jaune-Orange	Jaune-Orange	Jaune-Orange
<b>Formule chimique</b>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
<b>Structure</b>						
<b>Solubilité</b>						
<b>Soluble</b>	MeOH, EtOH, CHCl <sub>3</sub> , acétone, CH <sub>3</sub> COOH glacial, MIBC, DMSO	MeOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , CHCl <sub>3</sub> , DMSO	MeOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , CHCl <sub>3</sub> , DMSO	MeOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , CHCl <sub>3</sub> , DMSO		
<b>Légèrement soluble</b>	H <sub>2</sub> O	Me <sub>2</sub> CO, H <sub>2</sub> O, EtOAc, CH <sub>3</sub> CN	Me <sub>2</sub> CO, H <sub>2</sub> O, EtOAc, CH <sub>3</sub> CN	Me <sub>2</sub> CO, H <sub>2</sub> O, EtOAc, CH <sub>3</sub> CN		
<b>Peu soluble</b>	Ether, benzène, hexane					
<b>Insoluble</b>		Hexane	Hexane	Hexane		
<b>UV dans le MeOH : λ max en nm (log ε)</b>	250 (3,80), 311 (3,75), 388 (4,04)	302 (3,87), 402 (3,97)	302 (3,85), 402 (3,96)	308 (3,70), 389 (3,92)	246 (3,81), 302 (3,49), 388 (4,05)	246 (3,89), 302 (3,63), 388 (4,16)
<b>IR dans le KBr : ν max en cm<sup>-1</sup></b>	1550, 1600, 1633, 1666, 3205	1225, 1520, 1600, 1635, 1655, 1680, 3270	1210, 1500, 1600, 1650, 1670, 3220	1225, 1540, 1600, 1650, 1680, 3280	1553, 1600, 1639, 1661, 3225	1530, 1575, 1630, 1645, 3100
<b>EI-MS (m/z)</b>		268 (M <sup>+</sup> ), 186, 83, 55	268 (M <sup>+</sup> ), 186, 83, 55	256 (M <sup>+</sup> ), 186, 43	214 (M <sup>+</sup> ), 172, 43	228 (M <sup>+</sup> ), 172, 57
<b>RMN <sup>1</sup>H (δ en ppm, multiplicité, constante de couplage en Hz)</b>						
	300 MHz (DMSO-d <sub>6</sub> )	300 MHz (CDCl <sub>3</sub> )	300 MHz (CDCl <sub>3</sub> )	300 MHz (CDCl <sub>3</sub> )	100 MHz (DMSO-d <sub>6</sub> )	
H-3	7,30 (1H, s)	6,62 (1H, s)	6,63 (1H, s)	6,65 (1H, s)	7,05 (1H, s)	
N(4)-CH <sub>3</sub>	3,20 (3H, s)	3,37 (3H, s)	3,37 (3H, s)	3,37 (3H, s)		
N(4)-H					9,86 (1H, s)	
C(6)-NH	9,95 (1H, s large)	7,43 (1H, s large)	7,69 (1H, s large)	7,45 (1H, s large)	10,68 (1H, s)	
<b>Groupement acyl</b>	2,5 (3H, s)	5,71 (1H, m), 2,25 (3H, d, 1)	6,65 (1H, m), 1,92 (3H, s large), 1,83 (3H, d, 8)	2,33 (2H, t, 7), 1,74 (2H, sxt, 7), 1,00 (3H, t, 7)	2,03 (3H, s)	

# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

### I. Matériel

#### I. Microorganismes

##### 1. Souche d'actinobactérie SA 233

La souche d'actinobactérie étudiée (numéro de code SA 233) appartient au genre *Saccharothrix*. Elle a été isolée à partir d'un échantillon de sol non rhizosphérique de la palmeraie d'Adrar (**Boudjella, 1994**).

La souche de SA 233 est conservée à 4°C par repiquages successifs sur milieu solide ISP<sub>2</sub> (**Shirling et Gottlieb, 1966**) dont la composition est donnée en annexe et par lyophilisation dans du lait écrémé.

##### 2. Souches de microorganismes-cibles

Plusieurs souches-cibles sont utilisées. Il s'agit de bactéries (Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>), de champignons et de levures. Certaines d'entre elles sont cataloguées dans des collections mondiales. Ces souches sont conservées au laboratoire sur milieu ISP<sub>2</sub> coulé en tubes à essai.

Les souches principales utilisées dans la majorité des expérimentations sont :

- Bactérie à Gram positif : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).
- Bactérie à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 10536).
- Levure : *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 4226).
- Champignon filamenteux : *Mucor ramannianus* (NRRL 1829).

D'autres microorganismes-cibles ont été utilisés afin de déterminer le spectre d'action de l'actinobactérie et les concentrations minimales inhibitrices des différents antibiotiques (**Zitouni, 2004; Lamari, 2006; Merrouche 2012**).

### II. Méthodes

#### I.- Etude taxonomique de la souche d'actinobactérie SA 233

##### 1. Etude morphologique

###### 1.1 Macromorphologie

Cette étude consiste à noter la croissance de la souche, l'aspect et la couleur des mycéliums aériens et du substrat et la production et la couleur des pigments diffusibles sur les milieux de culture suivants : l'ISP<sub>2</sub>, l'ISP<sub>3</sub> et l'ISP<sub>4</sub>, préconisés lors de «l'International *Streptomyces* Project» ou ISP (**Shirling et Gottlieb, 1966**). La composition des milieux est donnée en annexe.

## Matériel et méthodes

---

Les différentes couleurs sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color : ISCC-NBS) (Zitouni, 2004; Lamari, 2006).

### 1.2 Micromorphologie

La souche poussant sur les différents milieux cités précédemment est observée au microscope optique Zeiss en utilisant les grossissements 10 x 10 et 10 x 40. Ces observations sont réalisées directement sur la boîte de Pétri de manière à bien repérer les structures en place (sporulation du mycélium aérien, fragmentation ou non du mycélium du substrat, etc.). L'étude micromorphologique est essentielle pour la reconnaissance des genres (Zitouni 2004, Lamari, 2006).

### 2. Etude chimiotaxonomique

Cette étude consiste, en plus des études morphologiques, à compléter l'identification du genre. Les analyses sont effectuées sur des hydrolysats ou des extraits cellulaires, par chromatographie descendante sur papier pour la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique ou DAP (forme LL ou DL) et la présence ou non de glycine au niveau pariétal et par chromatographie ascendante sur couche mince, pour connaître la composition cellulaire en sucres et en phospholipides membranaires et pour noter la présence ou non d'acides mycoliques. La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour la détermination des acides gras (Lamari *et al.*, 2002a; Zitouni *et al.* 2004a).

### 3. Etude physiologique

Soixante-dix tests physiologiques sont retenus pour l'identification de notre souche. L'observation des pigments mélanoides est réalisée sur différents milieux recommandés à cet effet par Shirling et Gottlieb (1966). La mise en évidence de la nitrate réductase se fait sur bouillon nitrate et celle de la lipase sur gélose nutritive additionnée de tween 80 (Marchal et Bourdon, 1973). L'utilisation des composés glucidiques comme seule sources de carbone a été étudié. Les glucides testés comme seule source de carbone sont les suivants : adonitol, arabinose, cellobiose, dextrine, inositol, mannitol, mannose, mélibiose, raffinose, rhamnose, ribose, saccharose, tréhalose, fructose, galactose, glucose, maltose et xylose. La capacité de la souche à dégrader divers autres composés organiques (ex. la tyrosine, de l'hypoxanthine, de la xanthine, l'amidon, la testostérone, du tween 80, etc) a été également testé (Lamari, 2006). Les tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques on été également évalués (sensibilité au lysozyme, pH, température et sensibilité aux antibiotiques) (Athalye *et al.*, 1985).

### 4. Etude moléculaire

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

La classification génétique de l'espèce de cette actinobactérie est basée essentiellement sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S). Le choix de ce gène est justifié par l'existence de zones génétiquement conservées pour chaque espèce d'actinobactérie, ce qui constitue un outil moléculaire important pour la taxonomie. Les étapes de séquençages sont les suivantes :

- Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S
- Analyse des produits PCR par électrophorèse
- Séquençage du gène codant pour l'ARN 16S
- Analyse phylogénétique

L'hybridation ADN-ADN consiste en la réassociation des brins linéaires complémentaires d'ADN cibles et les brins de la sonde. Deux méthodes ont été utilisées: celle de Boehringer et la méthode spectroscopique (De Ley J. *et al.*, 1970).

## II. Etude des antibiotiques de la souche SA 233

### 1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieux solides

L'activité antimicrobienne de la souche SA 233 est évaluée par la méthode des stries croisées. La souche SA 233 est ensemencée en un seul trait à la surface du milieu ISP<sub>2</sub>. Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les microorganismes-cibles sont à leur tour inoculés par stries perpendiculaires à l'actinobactérie. La lecture des résultats est effectuée après 24 h (pour les bactéries) à 48 h (pour les champignons) et consiste en la mesure de la zone d'inhibition entre le bord de l'actinobactérie et le germe cible (Lamari, 2006).

### 2. Production des antibiotiques en milieux liquides

Le milieu de culture utilisé pour la production est le milieu semi-synthétique (SS) préconisé par Bouras (2005), dont la composition est donnée en annexe.

Des acides aminés (cystine et arginine) et des acides organiques (acide valérique, orbique et cinnamique) sont ajoutés au milieu SS à une concentration de 5 mM, afin d'étudier leur effet sur la production de nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*. Le choix des acides aminés et organique (à 5 mM) est basé sur les des résultats obtenu par Bouras (2005), qui a constaté l'apparition par HPLC de nouveaux pics de dithiopyrrolones en présence de ces précurseurs (Bouras, 2005; Merrouche, 2012).

### 2.1 Cinétique de production des antibiotiques en fonction des acides organiques et des acides aminés ajoutés au milieu de culture

Les cinétiques de production des antibiotiques ont été réalisées en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées et de détecter les nouvelles dithiolyrrolones induites par l'ajout des différents acides aminés et organiques.

Des pré-cultures sont préparées à partir de cultures mures âgées de 10 jours et poussant sur milieu solide ISP<sub>2</sub>. Les spores sont ainsi récupérées et inoculées dans fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, contenant chacune 50 ml de milieu de culture liquide. Les suspensions sont homogénéisées au vortex puis les fioles sont incubées à 30°C pendant 2 jours. Trois (3) ml (soit  $1 \pm 0,2$  mg) de pré-cultures servira à ensemençer 100 ml du même milieu liquide contenu dans des Erlenmeyers de 500 ml. Ces derniers sont incubés plusieurs jours à 30°C dans un shaker (250 rpm) (**Lamari, 2006; Merrouche 2012**).

L'évolution de l'activité antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement.

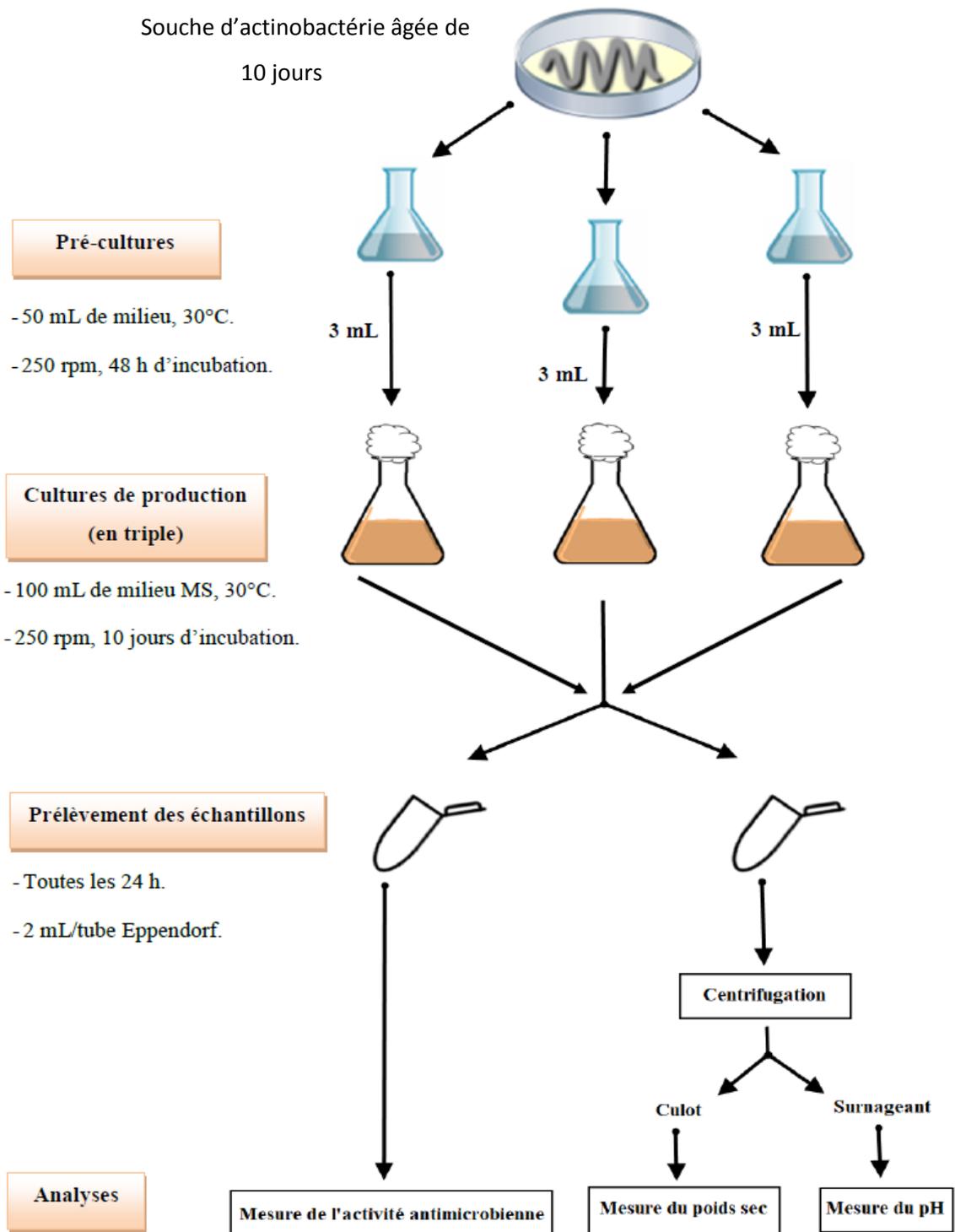
La Mesure du poids sec, consiste à peser la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu (**Pfefferle et al. 2000**). Pour chaque échantillon, 4 mL de culture sont prélevés et mis dans 2 tubes Eppendorf (2 mL par tube) préalablement séchées (24 h à 105°C) et tarés. Les tubes sont ensuite centrifugés à 16 000 x g pendant 15 min. Le culot est lavé deux fois avec du HCl (0,35 N) et à l'eau distillée pour éliminer le CaCO<sub>3</sub>. Par la suite, Les Eppendorfs contenant les culots cellulaires sont placés dans une étuve à 105°C pendant 24 h, puis pesés après refroidissement dans un dessiccateur. Le résultat est exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture (**Bouras, 2005**).

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des puits. Pour cela, le germe cible (*Bacillus subtilis* ou *Mucor ramannianus*) est ensemençé dans le milieu ISP<sub>2</sub> (contenant 12 g/l d'agar) maintenu en surfusion à 45°C, lequel est coulé par la suite dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre. Après solidification, des puits de 10 mm de diamètre sont réalisés dans le milieu (5 à 6 par boîte). Chaque puits reçoit 0,2 ml du filtrat de culture de l'actinbactérie (prélevé quotidiennement). Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles. Elles sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 36 h. Les diamètres d'inhibition autour des disques sont alors mesurés.

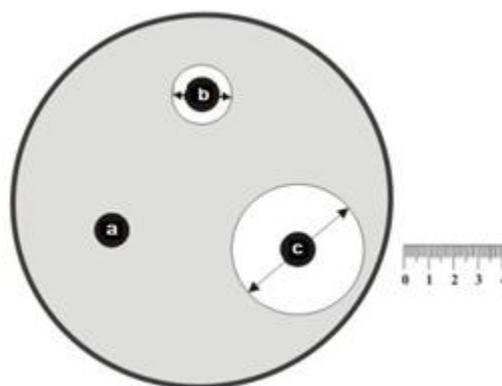
L'évolution du pH du milieu est mesurée grâce à un pH mètre et celle du poids sec, après lavage (à l'eau distillée) puis séchage du mycélium à 100°C durant 24 h.

La figure 6 illustre les étapes de la cinétique, et la figure 7 montre la méthode des puits.

## Matériel et méthodes



**Figure 6.** Schéma du protocole réalisé lors des cinétiques de production des antibiotiques sur milieux SS (sans et avec précurseurs), et mesure du poids sec et du pH.



**Figure 7.** Schéma représentatif de la méthode de diffusion des puits.  
Puit a: filtrat de culture non actif (souche résistante).  
Puit b: filtrat de culture à faible activité (souche peu sensible).  
Puit c: filtrat de culture à fort activité (souche sensible).

### 2.2 Production d'antibiotiques en grande quantité

Afin d'obtenir une quantité appréciable d'antibiotiques nécessaires aux analyses chimiques (pour déterminer les structures), plusieurs fermentations ont été entreprises sur le milieu SS témoin (sans précurseurs) et parès addition de précurseurs dans les mêmes conditions que celles citées ci-dessus. Au total, 12 L de culture pour chaque milieu sont obtenus (**Lamari, 2005; Merrouche 2012**).

### 2.3 Extraction des antibiotiques et antibiographie

L'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de culture de chaque milieu est réalisée à l'aide de dichlorométhane, après une durée (définie lors des expériences précédentes) correspondant à la production optimale de ces substances. Le dichlorométhane est noté comme le meilleur solvant d'extraction après des études réalisées par Lamari (**2006**). Le filtrat de culture, débarrassé du mycélium, subit une extraction avec le dichlorométhane. Pour cela 100 ml de filtrat de culture sont extraits par le même volume du solvant organique dans une ampoule à décanter, à température ambiante. La phase organique est récupérée séparément, filtrée sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau, puis évaporée sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Lamari, 2006; Merrouche, 2012**).

L'extraction des antibiotiques est réalisée également à partir du mycélium, selon la méthode de Mechlinski (**1978**). Après centrifugation des cultures de la souche PAL114, le mycélium est recueilli, lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis égoutté. Un gramme de mycélium humide est extrait par 50 mL de méthanol, sous agitation durant 2 h à température ambiante. Après filtration, l'extrait méthanolique est concentré à sec, puis récupéré dans 1 mL de méthanol afin de le tester par antibiographie.

## Matériel et méthodes

---

Les extraits obtenus à partir des filtrats de culture et du mycélium sont testés par antibiographie contre les microorganismes cibles (sélectionnés pour leur sensibilité), c'est à dire, *Mucor ramannianus* et *Bacillus subtilis*. Pour cela, nous avons utilisé la technique des disques de papier de 6 mm de diamètre. Ces disques sont imbibés par 50 µl (pour les tests antibactériens) ou 80 µl (pour les tests antifongiques) d'extrait organique, puis séchés à 37°C durant 45 min avant d'être stérilisés sous UV à 254 nm durant le même temps et sous hotte axénique. Les disques sont ensuite déposés stérilement à la surface d'une gélose molle d'ISP<sub>2</sub> (12 g/l d'agar), préalablement ensemencée par le germe-test. Les boîtes sont ensuite mises 2 h à 4°C (voir méthode des puits) puis incubées à 30°C. La lecture des résultats est effectuée après 24 (pour la bactérie) à 48 h (pour le champignon) et consiste à déterminer le diamètre de l'aurole d'inhibition autour du disque (Lamari 2006; Merrouche, 2012).

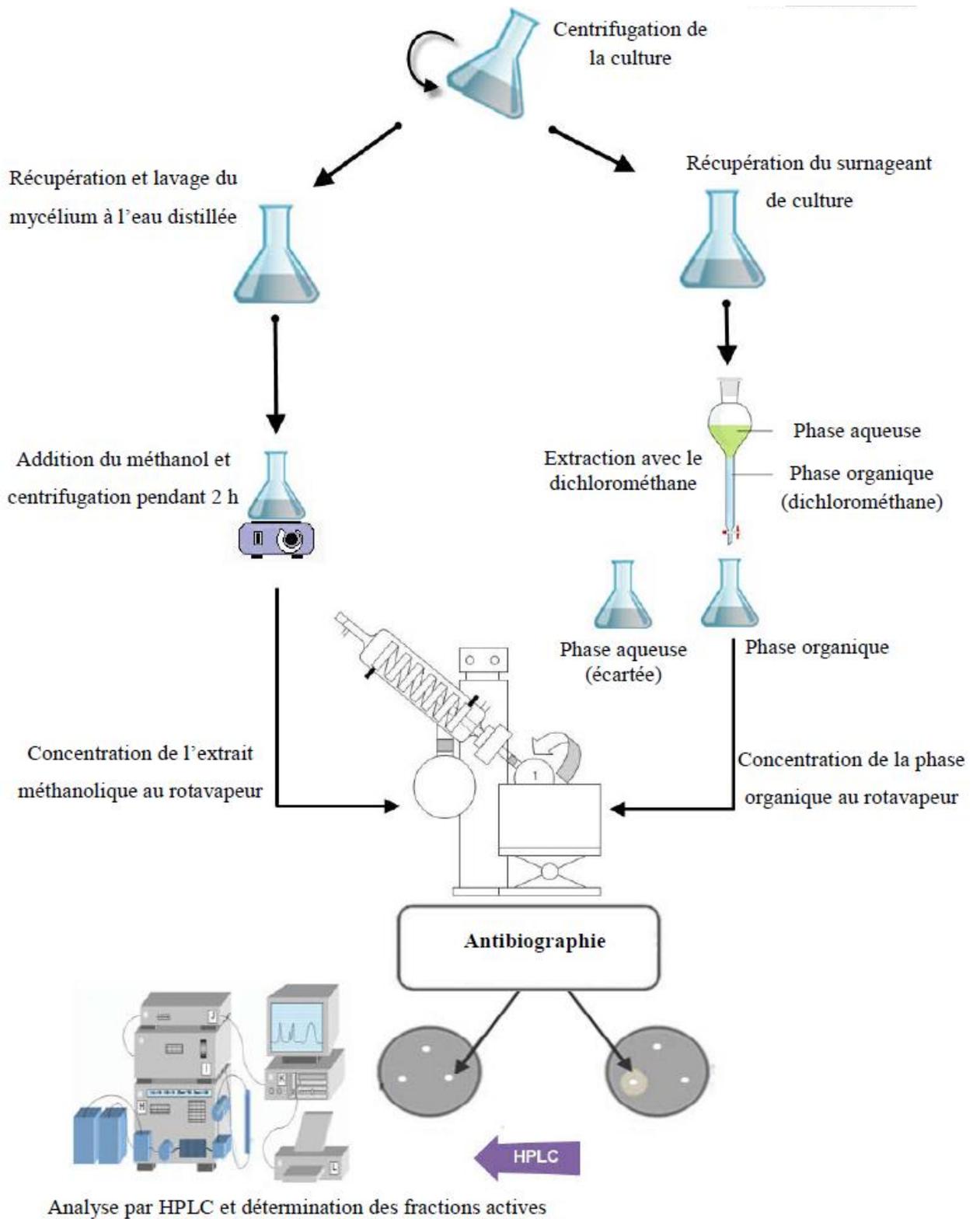
### 3. Analyse des extraits par HPLC analytique

Les antibiotiques produits par la souche SA 233 (lors des cinétiques) sont analysés par HPLC (Bio-Tek Instruments). Pour cela, 4 mL de chaque culture sont extraits par un volume égal de dichlorométhane. Les extraits sont évaporés à sec, puis repris dans 1 mL de méthanol dans des ampoules HPLC pour être analysés.

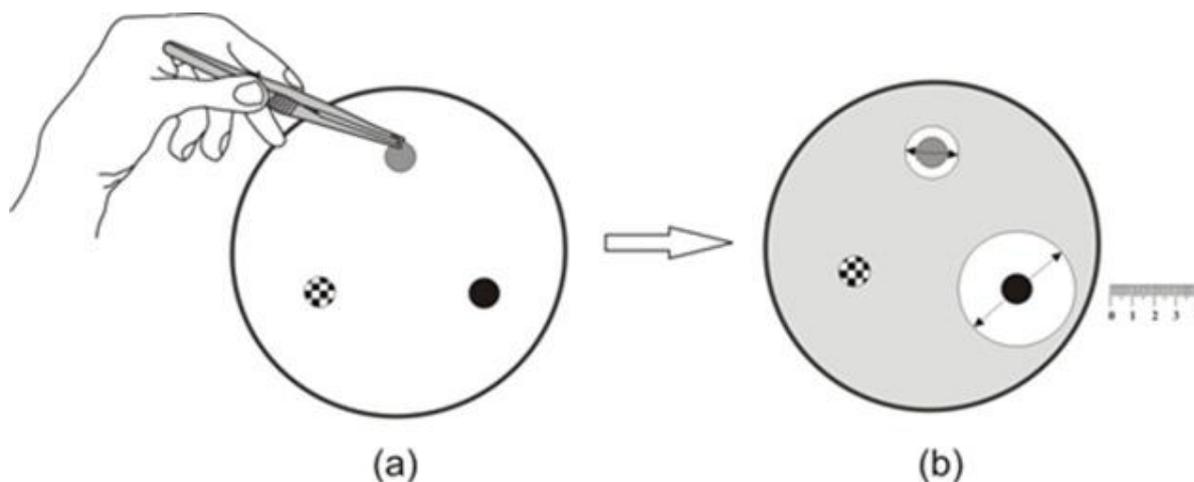
La phase mobile est constituée par un éluant dégazé de deux solvants, l'acétonitrile (solvant A) et de l'eau bidistillée (solvant B). La détection se fait à 220 nm et à 390 nm. Le débit d'élution utilisé est fixé à 0,8 mL/min et la température de la colonne, à 30°C. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 7 min. Par la suite, 6 µL de l'échantillon sont injectés (injecteur automatique) et analysés (Bouras 2005).

Le schéma général d'extraction, ainsi que Schéma représentatif de la méthode des disques de papier, sont présentés par les figures 8 et 9.

## Matériel et méthodes



**Figure 8.** Schéma général d'extraction et de mise en évidence des activités antimicrobiennes.



**Figure 9.** Schéma représentatif de la méthode des disques de papier.  
Disque 1 : extrait organique non actif (souche résistante).  
Disque 2 : extrait organique à faible activité (souche peu sensible).  
Disque 3 : extrait organique à forte activité (souche sensible).

#### 4. Semi-purification des antibiotiques

Les antibiotiques sont semi-purifiés sur couche épaisse de gel de silice G 60 (0,5 mm d'épaisseur) par chromatographie préparative et ce, dans le but d'avoir des quantités suffisantes d'antibiotiques pour les études ultérieures.

Les plaques de gel de silice de 20 cm de 20 cm, sont préparées après mélange de 50 g de gel de silice G60 (Merck) dans 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 500 ml. Après une forte et brève agitation (environ 30 s), la pâte est étalée de manière uniforme sur des plaques en verre propres (20 x 20 cm ou 10 x 10 cm) en utilisant l'étaleur de Desaga réglé de manière à obtenir une couche de 0,5 mm d'épaisseur. Les plaques sont séchées à 40°C pendant une nuit avant d'être utilisées.

Des quantités de 250 à 400 µl de chaque extrait concentré sont déposés en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci sont ensuite développées dans des cuves saturées 2 h auparavant par le système de solvant de migration [acétate d'éthyle - méthanol (100/15; v/v)], afin de localiser avec précision les bandes actives (une bioautographie est réalisée en parallèle). Une fois la migration terminée, la silice correspondant aux zones actives est alors grattée. Les antibiotiques sont désorbés dans 100 à 200 ml de méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice est par la suite éliminée après filtration sur verre fritté n° 4 (sous vide). Le filtrat méthanolique limpide est recueilli et son activité est contrôlée par antibiographie. Il est évaporé à sec puis conservé à - 30°C dans un congélateur pour pouvoir par la suite procéder à la purification finale des antibiotiques par HPLC (Lamari, 2006; Merrouche 2012).

### 5. Purification finale des antibiotiques par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une excellente méthode d'analyse et de purification. L'extrait semi-purifié par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice est solubilisé dans 2 mL de méthanol, ultrafiltré, puis injecté (0,5 à 1 mL par injection). L'éluant ou la phase mobile est un gradient discontinu d'un mélange méthanol-eau ultra pure précédemment dégazé pendant 15 min avec de l'hélium. Le gradient discontinu est de 50% de méthanol dans de l'eau. Ce gradient a été choisi en raison de son meilleur pouvoir de séparation des antibiotiques (choix fait après plusieurs essais préliminaires). Le débit de la phase mobile est de 2 ml/min et la longueur d'onde de détection dans l'UV est de 220 nm.

L'extrait semi-purifié par chromatographie sur plaques épaisses est solubilisé dans un minimum de méthanol ultrafiltré (filtre à 0,45 µm de porosité) puis injecté (0,5 à 2 ml par injection). Les différentes fractions obtenues sont récupérées séparément puis concentrées à sec sous air comprimé. Elles sont testées par antibiographie afin de localiser l'activité. Puis une deuxième ou une troisième injection est nécessaire pour la purification finale de l'antibiotique (**Lamari, 2006; Merrouche 2012**).

### 6. Etudes spectroscopiques des antibiotiques

#### 6.1 Spectroscopie UV-visible

L'étude spectroscopique dans l'UV-visible permet d'avoir un aperçu général sur le produit obtenu. A partir des spectres obtenus, elle nous renseigne sur la classe à laquelle appartient l'antibiotique en comparaison avec les antibiotiques connus et identifiés. Elle permet également de connaître le degré de saturation des molécules (présence ou non de doubles liaisons).

Le spectre UV-visible est déterminé en premier lieu sur les extraits butanoliques bruts, pour noter la présence ou non de polyènes, lesquels présentent 3 pics caractéristiques puis sur les antibiotiques après purification par HPLC. L'extrait est solubilisé dans du méthanol pur puis analysé à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU UV 260, précédemment étalonné avec du méthanol.

#### 6.2 Spectroscopie Infra-Rouge

Cette méthode permet la détermination de certains groupes fonctionnels (amines, hydroxyles, carboxyles...), d'aromatiques, de méthyles, d'esters, de cétones etc., qui se caractérisent par l'apparition de bandes d'absorption dans l'Infra-Rouge (**Williams et Fleming, 1989**).

La méthode utilisée est celle de la pastille de bromure de potassium (KBr) : un milligramme d'antibiotique parfaitement sec est broyé dans un mortier d'agate avec 100 mg de bromure de

potassium (KBr). Ce dernier est utilisé car il ne présente aucune bande d'absorption dans l'Infra-Rouge. Le mélange homogène est placé dans un dispositif spécial permettant la réalisation d'une pastille circulaire translucide sous haute pression pendant 4 à 5 min. La pastille est placée dans un spectrophotomètre à Infra-Rouge (SHIMADZU IR 470) où elle est traversée par le flux lumineux entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.3 Spectrométrie de masse (par impact électronique direct)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui repose sur la détermination des masses moléculaires des échantillons. Elle permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des éléments présents dans l'échantillon analysé. L'analyse par spectrométrie de masse fait intervenir l'ionisation d'une très petite quantité du composé à analyser. Les éléments chargés qui en résultent sont soumis à l'action d'un champ magnétique. Le spectre de masse représente sous forme graphique l'abondance des ions de fragmentation.

La spectrométrie par impact électronique est une méthode d'ionisation utilisée pour les petites molécules organiques. Elle est provoquée par impact d'électrons sur des molécules gazeuses de l'échantillon dans la source avec apparition d'ions secondaires. Dans ce mode d'ionisation, les fragments neutres ne sont pas détectés. L'enregistrement est effectué avec un spectromètre Nermag R-10-10 C à 70 eV (Lamari, 2006; Merrouche, 2012).

### 6.4 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectroscopies RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , ont été utilisées pour la caractérisation des composés. Tous les signaux RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été assignés sur la base des déplacements chimiques ( $\delta$ ), des constantes de couplages ( $J$ ), des intensités du signal et des expériences par cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  et HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Les spectres RMN ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker AC - 300, avec les signaux de solvants comme références ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : DMSO 2,50/40,36) ou ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$  7,28 /77,45) à 300 MHz (pour RMN  $^1\text{H}$ ) et 75 MHz (pour RMN  $^{13}\text{C}$ ). Les informations de RMN  $^1\text{H}$ , sont apportées par les déplacements chimiques ( $\delta$ ) et aussi par la multiplicité des signaux et les constantes de couplages ( $J$ ) en Hz. Pour RMN  $^{13}\text{C}$ , on détecte les carbones présents dans la molécule par leurs déplacements chimiques et on différencie leur taux de substitution par le signe du signal (primaires et tertiaires, pics négatifs ; et secondaires et quaternaires : pics positifs), grâce aux spectres totalement découplés (Lamari, 2006; Merrouche, 2012).

## 7. Détermination des concentrations minimales d'inhibition des antibiotiques

## Matériel et méthodes

---

La détermination des CMI est réalisée par la méthode de diffusion dans l'agar selon la méthode préconisée par Oki *et al.* (1990). Une quantité précise d'antibiotique est dissoute dans un mélange d'eau (50%) et de méthanol (50%) afin de constituer la solution mère.

Des volumes précis de la solution mère sont ajoutés à des lots de 4 ml de gélose nutritive, contenue dans des tubes à vis, de telle sorte que les concentrations finales des antibiotiques dans chacun des lots soient de 20, 40, 50, 60, 70, 80 et 100 µg/ml. Les différents lots de milieu sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 5 cm de diamètre. Les témoins sans antibiotiques sont réalisés de la même manière en utilisant les mêmes volumes du mélange méthanol-eau (50% - 50%).

Les différents germes-cibles (bactéries, champignons et levures) sont ensemencés par point en déposant 2 µl de la suspension bactérienne ou levuriennes ou encore de spores fongiques, à la surface du milieu, de telle sorte que l'inoculum soit de  $10^3$  cellules ou spores pour les levures et les champignons et de  $10^6$  cellules pour les bactéries. Deux essais sont réalisés par souche.

La lecture est effectuée après 24 d'incubation à 30°C pour les bactéries et après 48 h d'incubation pour les champignons; elle consiste à évaluer la croissance des micro-organismes utilisés et déterminer ainsi la concentration minimale qui inhibe totalement la croissance du germe (**Lamari 2006; Merrouche, 2012**).

# **Chapitre 3**

## **Résultats et discussion**

### I. Résultats

#### I. Etude taxonomique de l'isolat d'actinobactérie SA 233

##### 1. Détermination du genre

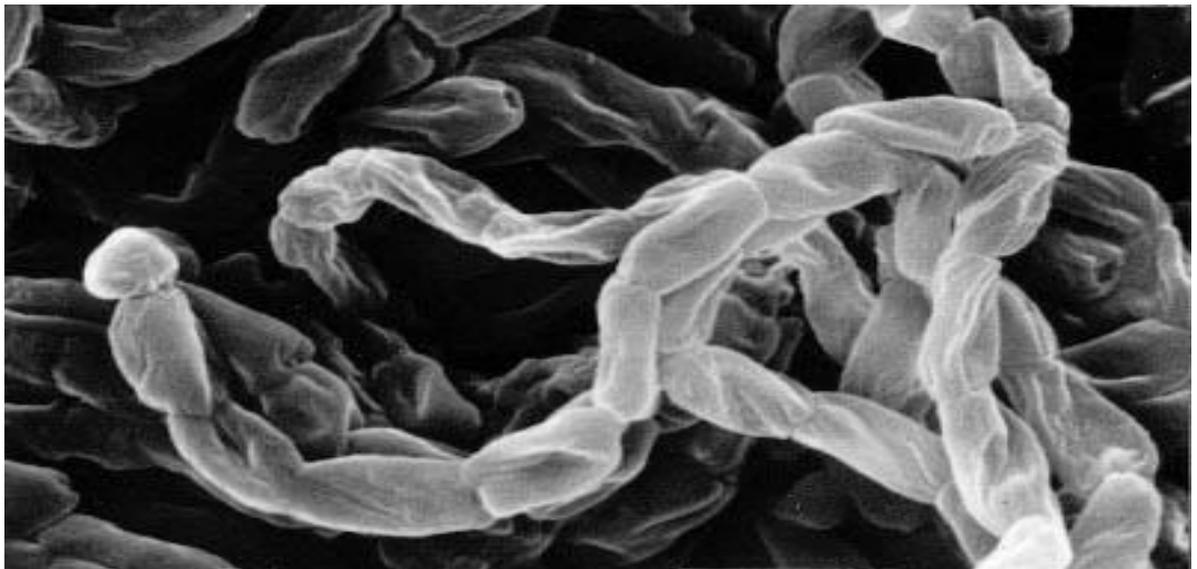
L'identification du genre est basée sur des critères morphologiques et chimiques.

##### 1.1 Caractéristiques morphologiques

L'isolat SA 233 présente une croissance et une sporulation abondante sur les milieux ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>5</sub>, ISP<sub>7</sub>. La croissance est aussi abondante sur ISP<sub>1</sub> et ISP<sub>6</sub> mais sans production de mycélium aérien; elle est par contre moyenne sur ISP<sub>3</sub> et gélose nutritive et faible sur ISP<sub>4</sub>. La couleur du mycélium aérien est jaune clair à jaune orange et celle du mycélium du substrat et des pigments diffusibles, jaune vif, jaune orangé ou brun-jaunâtre selon les milieux utilisés.

Le mycélium du substrat de l'isolat SA 233 est ramifié et se fragmente assez peu ou pas sur les milieux solides et liquides. La fragmentation (faible) ne s'observe que lorsque les cultures sont âgées. Le mycélium aérien est constitué de filaments ramifiés et flexueux qui se fragmentent de manière anarchique en de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets (0,7 ~ 0,8 x 1~ 2 µm), à surface lisse et non mobiles. Les sporophores, les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotes sont absents (Zitouni, 2005; Lamari, 2006).

La figure 10 montre les chaînes de spores à surface lisse du mycélium aérien, observé au microscope électronique à balayage.



**Figure 10.** Isolat SA 233 vu au microscope électronique à balayage. La barre indique l'échelle.

- Micrographie du haut: fragmentation totale du mycélium aérien en de longues chaînes de spores.
- Micrographie du bas: détail des chaînes de spores en bâtonnets et à surface lisse du mycélium aérien.

### 1.2 Analyse chimique des constituants cellulaires

L'étude chimique des constituants cellulaires de l'isolat SA 233 (tableau 7) a révélé la présence dans la paroi de l'isomère DL (méso) de l'acide diaminopimélique et l'absence de glycine. Les autres acides aminés présents sont l'alanine et l'acide glutamique (retrouvés dans la paroi des procaryotes), ainsi que la leucine et la valine. Les sucres taxonomiquement importants et présents dans les cellules entières sont le rhamnose et le galactose, ainsi que le glucose, le mannose et le ribose.

L'analyse des phospholipides a montré la présence de la phosphatidyl éthanolamine (PE) et de la phosphatidyl hydroxy éthanolamine (OH-PE) détectées par la ninhydrine, ainsi que des phospholipides contenant de la glucosamine (PG), au nombre de trois. En revanche aucune trace de phosphatidylcholine n'a été décelée (**Lamai et al., 2002a; Zitouni et al., 2004a**).

### 1.3 Identification du genre

La présence chez l'isolat SA 233 de l'acide diaminopimélique sous sa forme DL (méso) et l'absence de glycine correspondent à la paroi de type III selon Lechevalier et Lechevalier (**1970**). L'hydrolysats cellulaire par  $H_2SO_4$  montre l'existence du rhamnose et du galactose, ce qui correspond au chimiotype III E selon Labeda et Kroppensted (**2000**). Les phospholipides sont du type PIV (PE + OH-PE + PG) (**Lechevalier et al., 1977**). L'acide gras prédominant est l'iso-hexadécanoate ramifié (iso  $C_{16:0}$ ) ainsi que l'iso H- $C_{16:0}$ , l'iso-2-OH- $C_{16:0}$  et l'iso- $C_{15:0}$ . Les acides mycoliques sont absents.

Les caractéristiques morphologiques et chimiques permettent de conclure clairement que la souche SA 233 appartient au genre *Saccharothrix* (**Labeda et al., 1984**).

Par rapport aux espèces connues *Saccharothrix*, à l'exception de *Saccharothrix australiensis* qui possède des phospholipides de type PIV (phosphatidyléthanolamine ou PE + OH-PE + phospholipides contenant de la glucosamine) (**Labeda et al., 1984**), les autres espèces contiennent le type PII (PE + OH-PE) (**Labeda, 2002**). L'isolat SA 233 se rapproche donc plus de *Saccharothrix australiensis* de ce point de vue.

## 2. Détermination de l'espèce

La détermination des espèces est basée sur les caractéristiques physiologiques et moléculaires.

### 2.1 Etude physiologique

L'isolat SA 233 utilise un certain nombre de composés organiques, comme la tyrosine, la caséine, la gélatine l'esculine et le tween 80. Elle réduit les nitrates mais ne dégrade pas

## Résultats et discussion

l'adénine, l'arbutine, la guanine, l'hypoxanthine et l'amidon. Le nombre de glucides (et dérivés) utilisés est assez restreint puisque sur les 25 testés, seuls le glucose, le galactose, le fructose, le maltose, le tréhalose et le glycérol sont utilisés. La souche croît à pH 5 et 9 et en présence de lysozyme (à 0,005%), de tellurite de potassium (0,01%), de crystal violet (0,001%) et de phénol (0,05%). SA 233 est résistante à la cyclosérine (10 µg/ml), la gentamicine (5 µg/ml), l'oxytétracycline (25 µg/ml), la rifampicine (5 µg/ml), la streptomycine (10 µg/ml) et la vancomycine (5 µg/ml) (Zitouni, 2005; Lamari, 2006).

### 2.2 Etude moléculaire

#### 2.2.1 Séquençage de l'ADNr 16S

La séquence de l'ADNr 16S de *Saccharothrix* sp. SA 233 a été déposée au niveau de la GenBank (USA) sous le numéro d'accèsion AY054972. La comparaison de la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat SA 233 avec celles des espèces connues de *Saccharothrix* a donné des pourcentages de similarité allant de 97,5% à 98,8 % (Tableau 6). Ce résultat confirme donc l'appartenance de SA 233 au genre *Saccharothrix*. Le pourcentage le plus élevé est celui obtenu avec la souche type de *Saccharothrix australiensis* NRRL 11239<sup>T</sup> (Zitouni *et al.*, 2004a). La figure 11 montre l'arbre phylogénétique indiquant la position taxonomique de *Saccharothrix* sp. SA 233 par rapport aux autres espèces du même genre.

**Tableau 6.** Pourcentage de similarité des espèces de *Saccharothrix* par rapport à la souche SA 233.

Espèces	% de similarité
<i>Sa. australiensis</i>	98,8
<i>Sa. syringae</i>	98,3
<i>Sa. espanaensis</i>	98,2
<i>Sa. coeruleofusca</i>	98,1
<i>Sa. texaensis</i>	97,8
<i>Sa. longispora</i>	97,4
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>mutabilis</i>	97,1
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>capreolus</i>	96,7
<i>Sa. tangerinus</i>	96,7

#### 2.2.2 Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN a été réalisée entre l'isolat SA 233 et la souche type NRRL-11239 de l'espèce la plus proche, *Sa. australiensis*. La première technique d'hybridation par la méthode de Boehringer que nous avons réalisé entre l'ADN génomique de l'isolat SA 233 et celui de la souche de *Saccharothrix australiensis* utilisé comme sonde a donné des résultats négatifs. En effet la coloration bleue (en utilisant le bleu de nitrotétrazolium) qui est une

## Résultats et discussion

preuve d'une hybridation positive entre l'ADN génomique de SA 233 et la sonde, n'est pas apparue. Ceci atteste que le pourcentage d'hybridation est inférieur à 70%. Cette méthode a le désavantage de ne pas donner le pourcentage d'hybridation. Cependant, la deuxième technique d'hybridation par la méthode spectroscopique, avec l'espèce *Sa. australiensis* NRRL 11239, a donné un pourcentage de similarité de 55,9 % (moyenne de deux essais). Ce pourcentage est nettement inférieur à 70%, limite qui permet de différencier les espèces entre elles (Wayne *et al.*, 1987). Ceci nous conduit donc à conclure que la souche SA 233 appartient à une nouvelle espèce de *Saccharothrix* dans le monde et a été nommée pour la circonstance *Sa. algeriensis*.

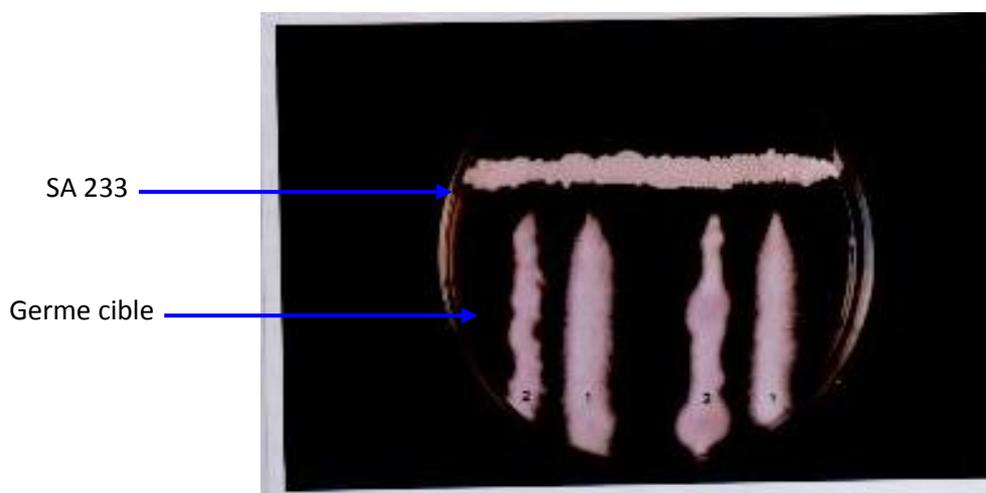
La souche SA 233 a été déposée dans deux collections mondiales, la NRRL (Peoria, USA) sous le numéro d'accession NRRL B-24137 et la DSM, sous le numéro DSM 44 581. Elle est considérée comme étant la souche-type de *Sa. algeriensis* (Zitouni *et al.* 2004a).

## II. Etude des antibiotiques produits par *Saccharothrix* SA 233

### 1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieux solides

La souche SA 233 est testée contre plusieurs microorganismes saprophytes ou pathogènes pour l'homme (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. etc.) ou pour les plantes (*Botrytis cinerea*, *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium sclerotiorum*, *Thielaviopsis neocaledoniae*, *Verticilium* sp. et quelques espèces de *Fusarium*).

Les résultats obtenus ont montré que l'activité est particulièrement importante contre la majorité des bactéries à Gram positif testées, forte, moyenne à faible contre les champignons et les levures et faible à nulle contre les bactéries à Gram négatif (Tableau 7)



**Figure 11.** Action antibiotique de la souche SA 233 contre *F.o. albedinis* (1) et *F.o. lini* (2) par la méthode des stries croisées.

## Résultats et discussion

**Tableau 7.** Action antibiotique de la souche SA 233 contre les bactéries et les champignons sur milieu ISP<sub>2</sub>.

<b>Microorganismes - cibles</b>		<b>Méthode des stries croisées (en mm)</b>
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i>	16
	<i>Micrococcus luteus</i>	32
	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
	<i>Enterococcus faecalis</i>	09
Bactéries à Gram négatif	<i>Alcaligenes faecalis</i>	09
	<i>Escherichia coli</i>	11
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
	<i>Proteus mirabilis</i>	02
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	05
	<i>Serratia marcescens</i>	3 (ral.)
Levures	<i>Candida albicans</i>	09
	<i>Debaryomyces subglossus</i>	05
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	08
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	07
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
Champignons	<i>Alternaria sp.</i>	17
	<i>Aspergillus niger</i>	04
	<i>Botrytis cinerea</i>	11
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	12
	<i>F. o. ciceri</i>	02
	<i>F. o. lentis</i>	05
	<i>F. o. lini</i>	08
	<i>F.o. lycopersici</i>	10
	<i>Fusarium culmorum</i>	07
	<i>Fusarium graminearum</i>	09
	<i>Geotrichum candidum</i>	11
	<i>Mucor ramannianus</i>	21
	<i>Penicillium purpureum</i>	12
	<i>Penicillium sp.</i>	12
	<i>Pythium irregulare</i>	17
	<i>Rhizoctonia solani</i>	16
	<i>Sclerotium sclerotiorum</i>	17
	<i>Thielaviopsis neocaledoniae</i>	30
<i>Verticillium sp.</i>	13	

### **2. Cinétique de production des antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA 233 sur milieu semi-synthétique en fonction des acides organiques et des acides aminés**

Des cinétiques de croissance et de production des antibiotiques sont réalisées pendant 10 jours d'incubation à 30°C sur milieu semi-synthétique (SS) témoin (sans précurseurs) et sur milieu SS additionné d'acides organiques (valérique, sorbique et cinnamique) et d'acides aminés (cystine et arginine). Au cours de la fermentation, l'évolution du poids sec du mycélium, du pH du milieu et de l'activité antimicrobienne est suivie quotidiennement. Les antibiotiques produits par l'actinobactérie ont été dosés par HPLC analytique sur colonne C18 du 1<sup>er</sup> au 10<sup>ème</sup> jour d'incubation (Lamari 2002; Merrouche, 2012).

#### **2.1 Evolution de la biomasse**

Les cinétiques de croissance de *Saccharothrix* sp. SA 233 dans le milieu SS témoin et en présence d'acides organiques et d'acides aminés ajoutés sont présentés dans la figure 12.

Une croissance diauxique a été noté dans tous les milieux de culture, à l'exception du milieu SS + cystine. La croissance de *Sa. algeriensis* peut ainsi être subdivisée en plusieurs phases.

- La croissance débute par phase exponentielle, d'une durée de 24 h à 48h.
- Une phase stationnaire est ensuite notée (sauf dans le cas de la cystine) d'une durée de 24 h à 48 h.
- Une seconde phase exponentielle a lieu après le 2<sup>ème</sup>, le 3<sup>ème</sup> ou le 4<sup>ème</sup> jour selon les cas.
- Une deuxième phase stationnaire est notée mais uniquement dans le milieu SS + arginine.
- Enfin, une phase de déclin d'une durée de 2 à 5 jours est observée,

#### **2.2 Evolution du pH**

Le pH du milieu augmente sensiblement (de 7 à 8 - 8,3) dans toutes les fermentations durant les premières 24 h (première phase exponentielle), pour plus au moins se stabiliser (pH entre 8 et 8,5) jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour avant de diminuer légèrement dans certains milieux (pH entre 7,7 et 8,2) (Figure 12).

#### **2.3 Evolution de l'activité antimicrobienne**

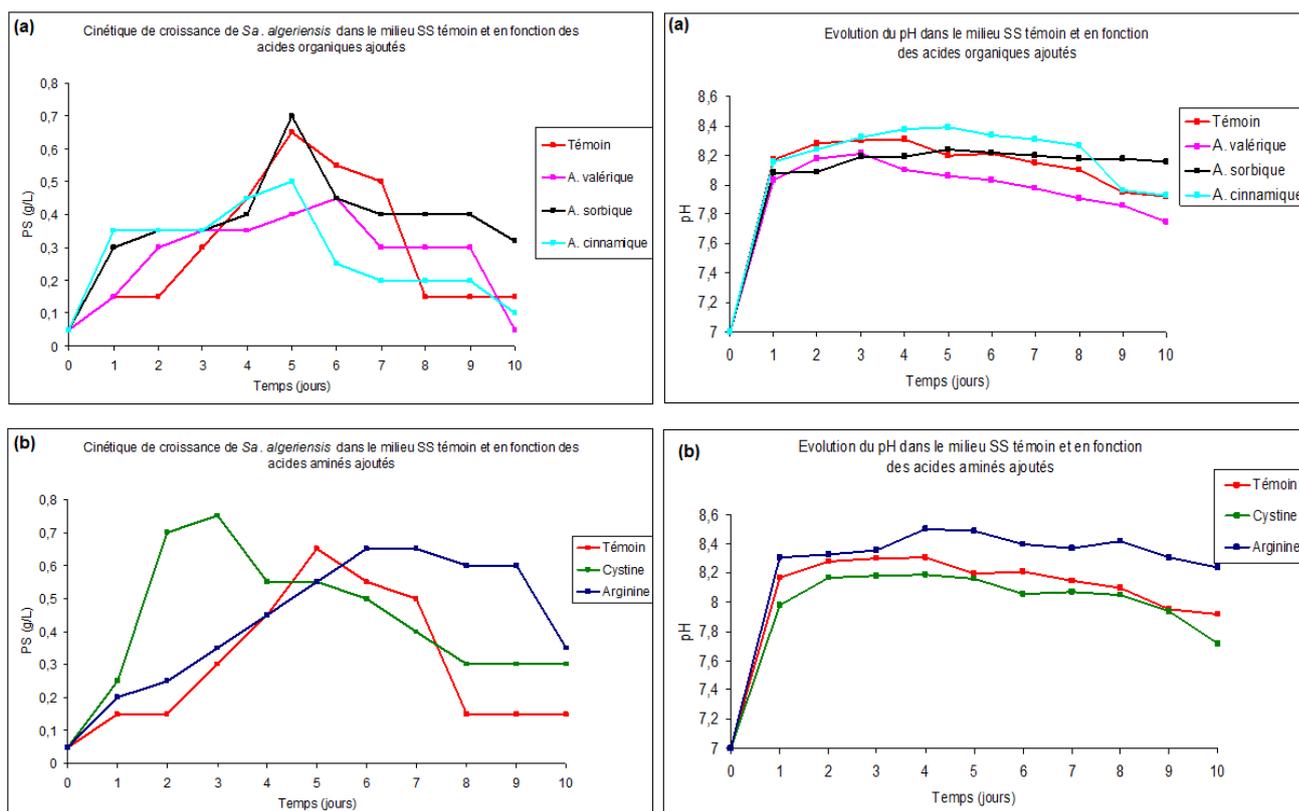
La mesure des diamètres d'inhibition (en mm) est effectuée par la méthode des puits, contre les microorganismes-cibles, *Bacillus subtilis* (activité antibactérienne) et *Mucor ramannianus* (activité antifongique).

Les résultats illustrés sur la figure 13 montrent que l'activité antibactérienne débute le 2<sup>ème</sup> ou le 3<sup>ème</sup> selon le milieu de culture. Cette activité est maximale entre le 5<sup>ème</sup> jour dans le milieu témoin et en présence des acides organiques et aminés.

## Résultats et discussion

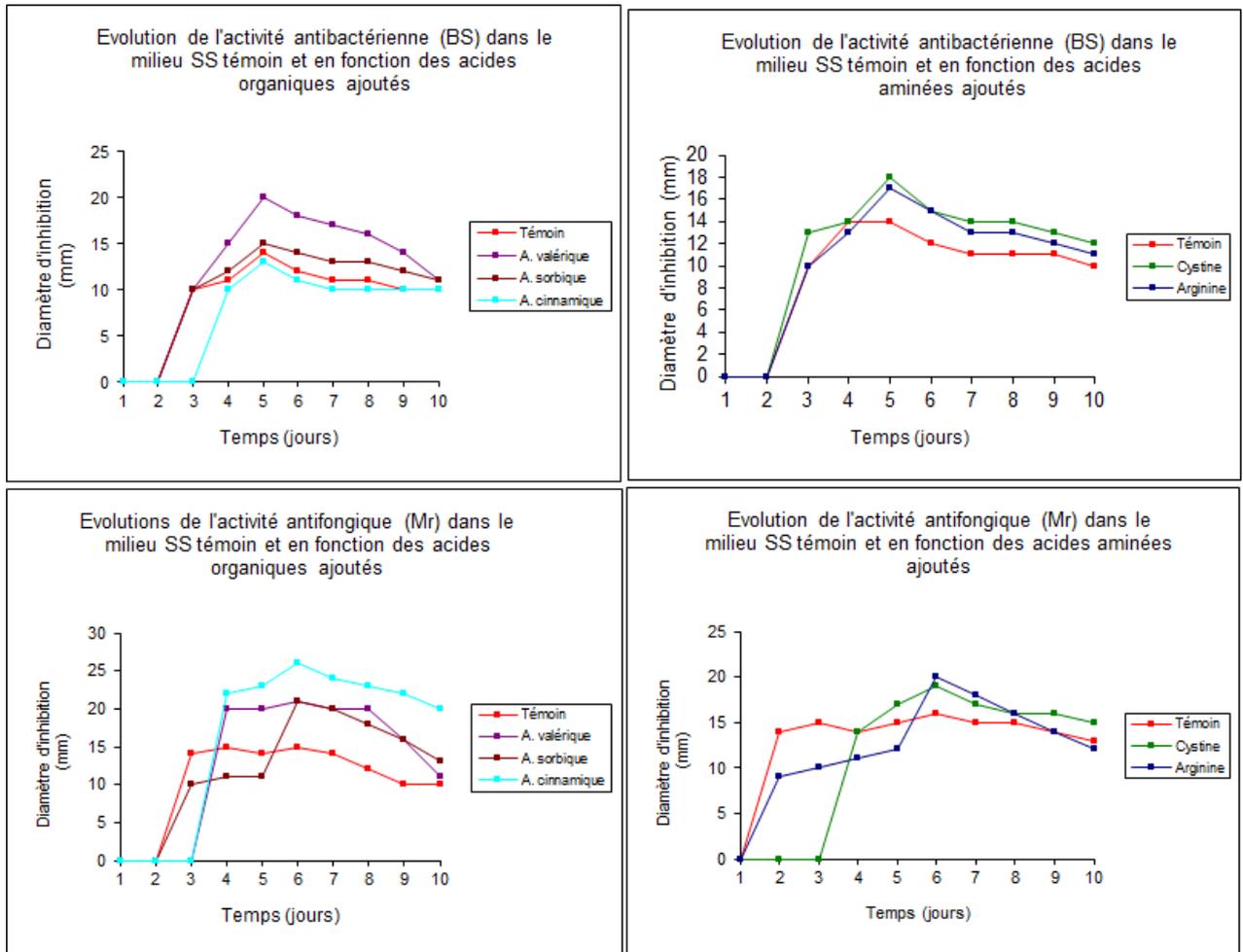
L'activité antifongique débute le 1<sup>er</sup>, le 2<sup>ème</sup> ou le 3<sup>ème</sup> jour, selon les fermentations. Le maximum de production est atteint généralement après cinq à six jours de fermentation.

Nous remarquons que l'activité antimicrobienne est majoritairement plus intéressante après l'addition des précurseurs (acides organiques et aminés) que dans le milieu témoin (sans précurseurs).



**Figure 12.** Evolution de la biomasse et du pH sur milieu SS au cours de la culture de *Saccharothrix* sp. SA 233 dans le milieu témoin (sans acides) et après ajout d'acides organiques (a) et d'acides aminés (b).

## Résultats et discussion



**Figure 13.** Cinétique des activités antibactériennes et antifongiques sur milieu SS témoin et après ajout des acides organiques et aminés chez *Saccharothrix* sp. SA 233. Bs: *B. subtilis*, Mr: *Mucor ramannianus*.

### 3. Analyse des extarits par HPLC analytique

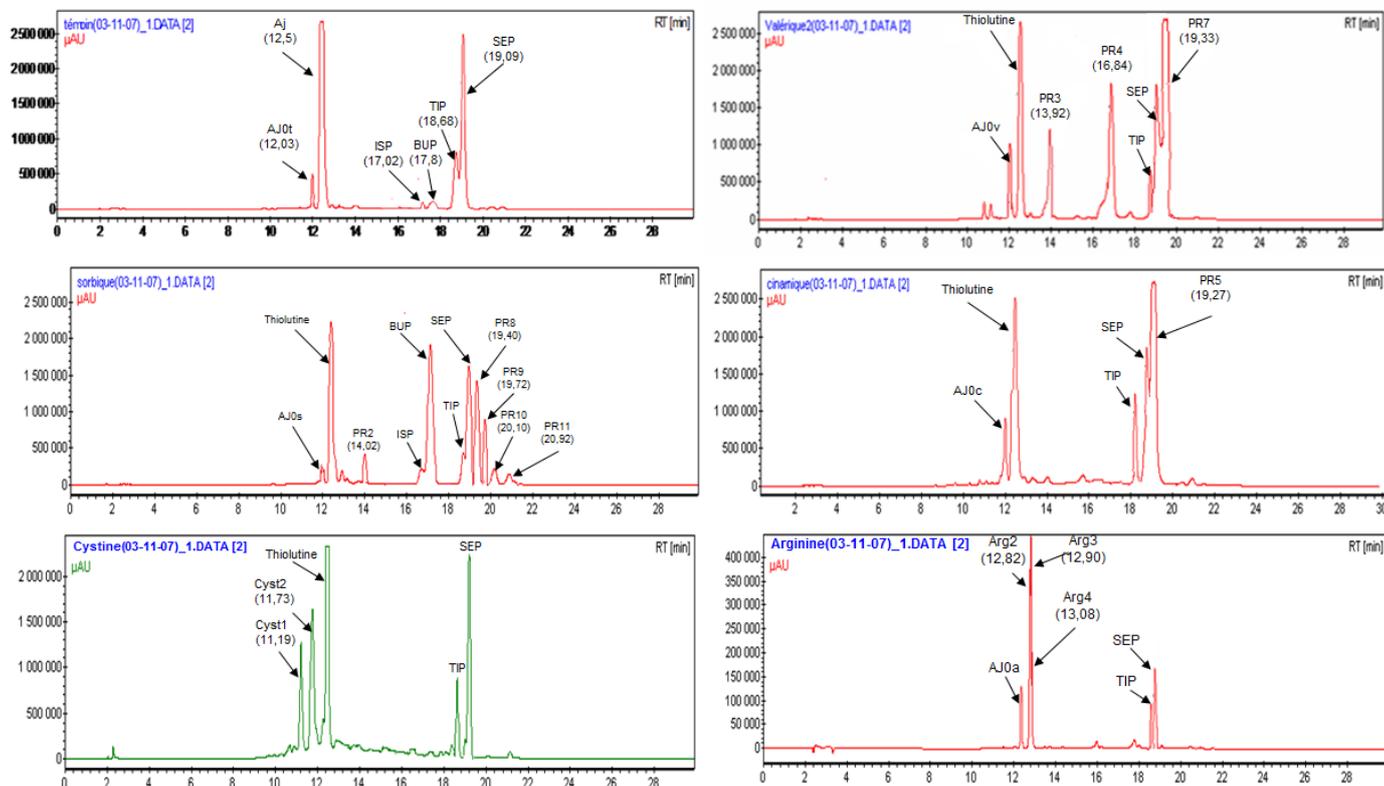
Les profils d'éluion en HPLC analytique des extarits brut des filtres de culture analysés (SS témoin et SS + précurseurs) ont montré (Figure 14) :

- Dans le milieu témoin, 6 molécules d'antibiotiques sont détectées à différents temps de rétention.

- L'addition des 3 acides organiques a permis l'apparition de 3 nouvelles molécules pour l'acide valérique (PR3, PR4 et PR7), 4 nouvelles molécules pour l'acide sorbique (PR2, PR8, PR9 et PR11) et une nouvelle molécule pour l'acide cinnamique (PR5). Ces nouvelles molécules diffèrent de celles produites dans le milieu témoin (sans précurseurs) par leur temps de rétention.

## Résultats et discussion

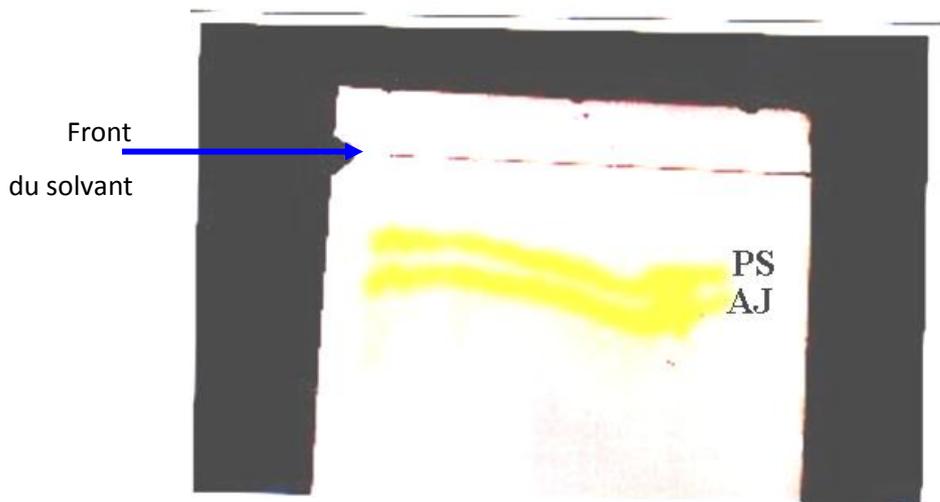
- L'addition des 2 acides aminés a permis la détection de 2 nouvelles molécules pour la cystine (cyst1 et cyst2) et de 3 nouvelles molécules pour l'arginine (Arg2, Arg3 et Arg4) à des temps de rétention différents (**Bouras 2005; Merrouche 2012**).



**Figure 14.** Profil d'élution en HPLC analytique (longueur d'onde  $\lambda = 390$  nm) montrant la présence des molécules bioactives synthétisées par *Saccharothrix* sp. SA 233 dans le milieu SS témoin sans précurseurs et après addition des acides organiques et aminés comme précurseurs.

### 4. Semi-purification des dithiopyrrolones

Les antibiotiques de la souche *Saccharothrix* sp. SA 233, ont été produits en grandes quantités sur les différents milieux de culture (SS témoin et SS + précurseurs). Après extraction et évaporation, les extraits bruts ont subi une semi-purification. Le développement des extraits bruts (spotés en traits continus) par le système de solvants AM, en utilisant des plaques épaisses de gel de silice, a permis d'obtenir dans chaque extrait deux bandes, AJ et PS facilement repérables par leur couleur jaune vif et leur Rf (Figure 15). Des bandes sont délimitées, grattées avec la silice et récupérées séparément. Les deux produits de chaque culture sont ensuite désorbés au méthanol, filtrés, séchés, puis analysés par HPLC pour la poursuite de la purification (**Lamari, 2006; Merrouche, 2012**).



**Figure 15.** Semi-purification des bandes actives AJ et PS de *Saccharothrix* sp. SA 233 sur plaques épaissees de gel de silice.

### 5. Purification des molécules bioactives produites dans le milieu témoin et celles induites par l'ajout des acides organiques et aminés

Des conditions semi-préparatives sont utilisées respectivement pour la purification des nouvelles dithiolopyrrolones induites par l'ajout d'acides organiques et d'acides aminés. Dans le cas de l'utilisation d'une colonne C18 semi-préparative, l'extrait sec est tout d'abord humecté avec du méthanol puis solubilisé dans du dichlorométhane (pour accroître sa solubilité) avant d'être injecté dans le système HPLC. La phase mobile est constituée par une solution de méthanol-eau avec un gradient qui diffère selon l'extrait purifié. En effet, chaque extrait nécessite une mise au point particulière pour bien séparer les molécules entre elles. Le débit utilisé est 2 ml/min et la détection se fait simultanément à des longueurs d'ondes de 220 nm et 390 nm (Lamari, 2006; Merrouche, 2012).

### 6. Etudes spectroscopiques des molécules bioactives produites dans le milieu témoin et celles induites par l'ajout des acides organiques et aminés

#### 6.1 Spectres dans l'UV-visible

Les résultats des spectres l'UV-visible des antibiotiques pures (solubilisées dans du méthanol) produites dans le milieu SS témoin (AJ0t, AJ, BUP, ISP, TIP et SEP) et celles induites par l'ajout d'acide valérique (AJ0v, PR3, PR4 et PR7), d'acide cinnamique (AJ0c et PR5), d'acide sorbique (AJ0s, PR2, PR8, PR9 et PR10), de cystine (Cyst1) et d'arginine (AJ0a, Arg2, Arg3 et Arg4) sont représentés du tableau 8 (Merrouche, 2012).

## Résultats et discussion

Les spectres présentent la même allure; ils possèdent trois maxima d'absorption, avec un épaulement pour certains. Le 1<sup>er</sup> maximum varie entre 202 et 207 nm, le deuxième est entre 300 et 314 nm, à l'exception de la molécule PR8 (270 et 304 nm) et le 3<sup>ème</sup> entre 389 et 413 nm.

### 6.2 Spectres de masse

La masse moléculaire (en impact électronique direct), a été déterminée pour les antibiotiques produits dans le milieu SS témoin, ainsi que pour les nouvelles molécules induites par l'ajout des acides organiques et aminés (Tableau 8).

Les molécules AJ0t, AJ0v, AJ0s, AJ0c et AJ0a possède le même poids moléculaire (PM = 214) et les mêmes fragments de masse. Ceci montre que l'on est en présence d'un même antibiotique, d'autant plus que ces molécules possèdent également le même spectre UV-visible et le même temps de rétention en HPLC.

Nous remarquons qu'il y'a des molécules qui sortent à des temps de rétention différents en HPLC, mais qui possèdent le même poids moléculaire; c'est le cas de PR4 et PR7 (PM = 270), PR9 et PR10 (PM = 282), Arg2, Arg3 et Arg4 (PM = 279). Ces molécules (ayant le même PM) semblent également être des isomères de position (**Merrouche, 2012**).

**Tableau 8.** Longueurs d'ondes maximales d'absorption en UV-visible et masses des dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin et après induction par l'addition d'acides organiques et d'acides aminés chez *Sa. algeriensis*.

Milieu SS	Molécule	UV-visible	PM	Fragments de Masse
Milieu SS témoin	AJ	207 - 313 - 389	228	186, 185, 154, 86, 70, 43.
	AJ0t	204 - 313 - 390	214	186, 185, 157, 86, 70, 45.
	BUP	203 - 311 - 389	256	186, 184, 85, 83, 50, 48.
	ISP	203 - 313 - 390	256	186, 185, 85, 83, 50, 48.
	TIP	210 - 300 - 396	268	186, 184, 85, 83, 82, 55, 48.
	SEP	214 - 304 - 399	268	186, 184, 157, 85, 82, 55, 41.
Milieu SS + acide valérique	AJ0v	206 - 312 - 390	214	186, 157, 86, 83, 48, 42.
	PR3	202 - 310 - 389	242	186, 184, 156, 130, 86, 56, 41.
	PR4	205 - 306 - 389	270	186, 185, 85, 83, 57, 48.
	PR7	208 - 307 - 392	270	186, 185, 86, 82, 56, 54, 40.
Milieu SS + acide sorbique	AJ0s	204 - 312 - 390	214	186, 185, 17, 130, 86, 70, 55.
	PR2	203 - 304 - 396	254	186, 184, 85, 83, 50, 48.
	PR8	202 - 304 - 413	280	186, 94, 85, 83, 50, 48.
	PR9	204 - 304 - 403	282	186, 85, 83, 54, 50, 48.
	PR10	202 - 304 - 398	282	186, 185, 157, 97, 84, 55.
	PR11	202 - 300 - 400	284	186, 185, 157, 130, 84, 55.
Milieu SS + acide cinnamique	AJ0c	206 - 313 - 390	214	186, 157, 86, 83, 48, 42.
	PR5	202 - 308 - 398	290	186, 105, 85, 83, 77, 50, 48.
Milieu SS + cystine	Cyst1	204 - 300 - 384	214	172, 117, 85, 83, 50, 48, 43.
Milieu SS + arginine	AJ0a	204 - 312 - 390	214	186, 157, 113, 85, 42.
	Arg2	206 - 311 - 389	279	186, 167, 149, 113, 71, 57, 43.
	Arg3	204 - 311 - 390	279	186, 167, 149, 113, 71, 57, 43.
	Arg4	204 - 311 - 389	279	186, 167, 149, 113, 71, 57, 43.

## Résultats et discussion

### 6.3 Spectres RMN

Les résultats des spectres RMN du proton et du carbone 13 des molécules bioactives produites sont donnés dans les tableaux 11 et 12. Les spectres RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  de tous les antibiotiques purifiées montrent des caractéristiques communes:

- un groupement NH ( $\delta_H$  8,19~07,49).
- Un méthyle lié au carbone n° 4 ( $\delta_H$  3,56~3,32 et  $\delta_c$  29,73~27,10), à l'exception de l'antibiotique cyst1 qui possède un proton à la place du  $\text{CH}_3$  ( $\delta_H$  8.19).
- un groupement oléfinique ( $\delta_H$  6,75~6,66).

**Tableau 9.** Données de la RMN du  $^1\text{H}$  des composés AJ0 (t, v, s et c), PR2, PR3, PR4, PR5, PR7, PR8, PR9, PR10, PR11 et Cyst1 (Merrouche, 2012).

	Solvant de solubilisation	H-3	N (4)-CH <sub>3</sub>	N(4)-H	C (6)-NH
AJ0 (t, v, s et c)	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.74	$\delta_H$ 3.36	-	$\delta_H$ 8.19
PR2	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.71~6.69	$\delta_H$ 3.35	-	$\delta_H$ 7.6
PR3	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.66	$\delta_H$ 3.35	-	$\delta_H$ 8.02
PR4	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.68	$\delta_H$ 3.34	-	$\delta_H$ 7.55
PR5	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.75	$\delta_H$ 3.40~3.35	-	$\delta_H$ 7.92~7.53
PR7	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.71~6.70	$\delta_H$ 3.35	-	$\delta_H$ 8.09
PR8	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.72	$\delta_H$ 3.35~3.34	-	$\delta_H$ 7.62
PR9	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 7.0~6.97	$\delta_H$ 3.35	-	$\delta_H$ 7.74~7.49
PR10	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.70	$\delta_H$ 3.35	-	$\delta_H$ 7.50
PR11	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.70	$\delta_H$ 3.35	-	$\delta_H$ 7.50
Cyst1	(CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$\delta_H$ 6.83	-	$\delta_H$ 8.19	$\delta_H$ 8.03

**Note:** CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = dichlorométhane.

## Résultats et discussion

**Tableau 10.** Données de la RMN du  $^{13}\text{C}$  des composés PR3, PR4, PR5 et PR7 (Merouche, 2012)

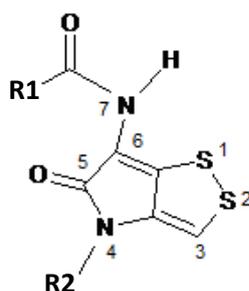
Position	PR3	PR4	PR5	PR7
<b>3</b>	$\delta_c$ 108.44	$\delta_c$ 108.49	$\delta_c$ 108.76	$\delta_c$ 108.76~108.56
<b>3a</b>			$\delta_c$ 132.38	$\delta_c$ 132.15
<b>N (4)-CH<sub>3</sub></b>	$\delta_c$ 29.73~27.56	$\delta_c$ 27.56~27.22		$\delta_c$ 27.56~27.22
<b>5</b>				$\delta_c$ 167.04
<b>6</b>			$\delta_c$ 113.69	$\delta_c$ 116.86~114.72
<b>6a</b>		$\delta_H$ 136.88		$\delta_c$ 137.02~136.84
<b>Noyau amide</b>	$\delta_c$ 171.90 $\delta_c$ 18.78 $\delta_c$ 13.46	$\delta_c$ 174.77 $\delta_c$ 17.05 $\delta_c$ 11.61		$\delta_c$ 171.62~164.44 $\delta_c$ 22.29 $\delta_c$ 19.86 $\delta_c$ 13.52

### 7. Détermination des structures chimiques des antibiotiques

La comparaison des différents résultats spectroscopiques (UV-visible, masse, RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ ) avec ceux présentés dans la littérature montre que les antibiotiques isolés de la souche d'actinobactérie *Saccharothrix* SA 233 sont des amides de la 6-amino-4,5-dihydro-4-méthyl-5-oxo-1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole. Ces antibiotiques diffèrent les uns des autres par la nature de l'acide réalisant l'amidification du squelette de base.

Le squelette de base, de formule brute  $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ , est illustré par la figure 62.

Tous les antibiotiques étudiés possèdent un  $\text{CH}_3$  au niveau du radical R2 et ne diffèrent entre eux que par la chaîne latérale R1 à l'exception de l'antibiotique cyst1 qui possède un H au niveau du R2 et un  $\text{CH}_3$  au niveau du R1 (Lamari et al., 2002b).



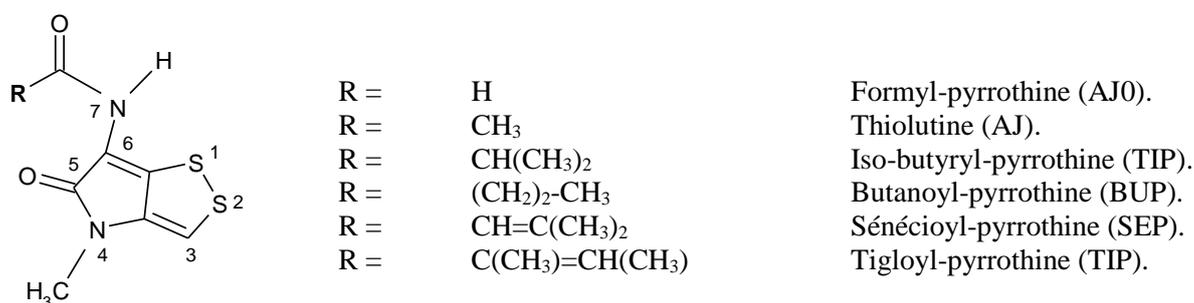
**Figure 16.** Squelette de base des dithiopyrrolones.

#### 7.1 Antibiotiques produits dans le milieu témoin

Les données spectroscopiques ont montré que six antibiotiques appartenant au groupe dithiopyrrolones sont produits dans le milieu SS témoin (sans précurseurs) par la souche

## Résultats et discussion

d'actionobactérie *Saccharothrix* sp. SA 233. La structure des antibiotiques est donnée dans la figure 17 (Lamari *et al.*, 2002b, Merrouche *et al.*, 2010).

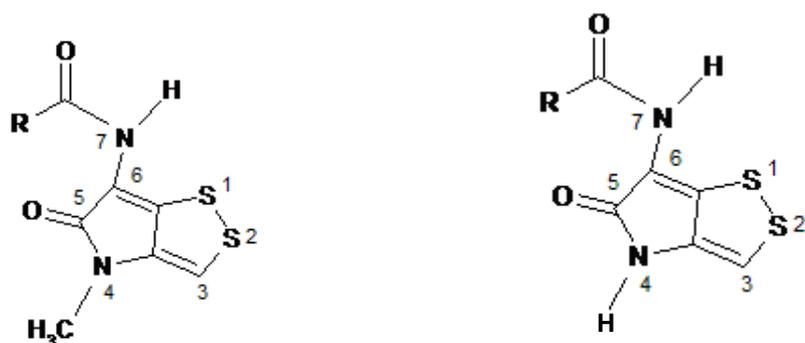


**Figure 18.** Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthétisés par *Saccharothrix* sp. SA 233 dans le milieu témoin.

### 7.2 Antibiotiques induits après addition de précurseurs

Les structures chimiques de 11 antibiotiques isolés ont été déterminées (Figure 18). La détermination de leur structure a été faite sur la base des données de RMN et de la spectrométrie de masse (Merrouche *et al.*, 2010, 2011, 2019, 2020).

Les quatre molécules Arg2, Arg3 et Arg4 et Cyst1 induites par l'addition de l'arginine et de la cystine, n'ont pas fait l'objet d'analyse en RMN et leur structure chimique n'a pas été déterminée.



R = H	Formyl-pyrrothine (AJ0)	R = CH <sub>3</sub>	Holomycine (cyst1)
R = CH=CH(CH <sub>3</sub> )	Crotonyl-pyrrothine (PR2)		
R = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Auréothricine (PR3)		
R = CH(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	Isovaléryl-pyrrothine (PR4)		
R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Benzoyl-pyrrothine (PR5)		
R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Valéryl-pyrrothine (PR7)		
R = CH=CH-CH=CH(CH <sub>3</sub> )	Sorbyl-pyrrothine (PR8)		
R = CH=CH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2-hexonyl-pyrrothine (PR9)		
R = CH=C(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	2-méthyl-3- pentényl-pyrrothine (PR10)		
R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Isopentyl formyl pyrrothine (PR11)		

**Figure 18.** Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthétisés par *Saccharothrix algeriensis* après l'ajout de précurseurs.

## Résultats et discussion

### 8. Détermination des concentrations minimales d'inhibition des antibiotiques (CMI)

A travers les valeurs des CMI obtenues dans le tableau 11, nous constatons que les bactéries à Gram positif sont majoritairement sensibles, contrairement aux bactéries à Gram négatif. Les champignons et les levures présentent une certaine sensibilité selon l'antibiotique utilisé. Plusieurs auteurs ont signalé que l'activité des dithiopyrrolones est influencé par la nature des groupement acyls (Oliva *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008).

**Tableau 13.** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des dithiopyrrolones pures sécrétées par *Saccharothrix algeriensis* dans le milieu SS après l'addition de précurseurs, vis-à-vis de divers microorganismes-cibles.

Microorganismes-tests	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )									
	AJO	Cyst1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR7	PR8	PR9	PR10
<i>Bacillus subtilis</i>	2	30	75	20	40	40	20	20	> 100	20
<i>Bacillus coagulans</i>	2	30	75	20	40	20	20	30	> 100	20
<i>Micrococcus luteus</i>	3	20	30	20	100	30	40	10	75	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	20	30	100	100	> 100	75	10	> 100	> 100
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	2	40	> 100	> 100	4	> 100	10	20	10
<i>Escherichia coli</i>	40	75	> 100	75	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
<i>Salmonella enterica</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
<i>Mucor ramannianus</i>	10	30	50	20	30	20	10	20	40	5
<i>Penicillium expansum</i>	3	100	75	20	40	20	20	20	> 100	40
<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	2
<i>Aspergillus carbonarius</i>	50	20	> 100	40	75	40	20	30	> 100	2
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lini</i>	30	50	> 100	40	75	40	50	75	> 100	50
<i>Fusarium moniliforme</i>	75	20	> 100	75	> 100	40	75	75	> 100	5
<i>Fusarium equiseti</i>	10	30	50	20	50	20	20	20	75	30
<i>Fusarium culmorum</i>	10	75	50	20	40	30	20	50	50	20
<i>Fusarium graminearum</i>	40	75	> 100	75	100	40	75	50	> 100	30
<i>Candida albicans</i>	75	75	> 100	75	75	30	20	50	50	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75	50	30	40	20	20	10	50	30	10

### II. Discussion

Parmi les nombreuses propriétés des actinobactéries, nous signalons leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques. Ceux-ci ont été étudiés surtout chez les *Streptomyces*, largement dominants dans de nombreux écosystèmes. Cependant durant ces dernières années, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nombreux antibiotiques, les recherches ont été orientées vers les genres peu fréquents à rares et provenant de milieux extrêmes (**Phoebe et al., 2001 ; Zitouni et al., 2004; Boubetra et al., 2013; Yekkour et al. 2015; Khebizi et al. 2018; Tata et al., 2019**).

En Algérie les recherches ont été entreprises sur les genres rares tels que *Saccharothrix*, *Nocardopsis*, *Planomonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, etc. (**Sabaou et al., 1992 et 1998; Boudjella, 1994; Zitouni et al., 2004; Boubetra et al., 2013; Bouznada et al., 2017**), provenant des sols sahariens.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressée à l'étude d'une souche d'actinobactérie, SA 233, du point de vue taxonomique et de l'étude détaillée de ses antibiotiques. La souche SA 233 a été isolée à partir d'un échantillon de sol de la palmeraie d'Adrar. Une étude morphologique (macro et micromorphologie) et une analyse de ses constituants cellulaires (acide diaminopimélique, sucres, phospholipides et acides gras) ont permis de la rattacher au genre *Saccharothrix*. Du point de vue cultural et physiologique, la souche diffère des espèces connues de *Saccharothrix*. L'étude moléculaire de la souche, entre autres le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et l'hybridation ADN-ADN, ont permis de la différencier nettement des espèces décrites actuellement dans la littérature et appartenant au genre *Saccharothrix*. En effet, les résultats de l'analyse de l'ADNr 16S ont donné un pourcentage de similitude de 98,8 % avec l'espèce la moins différente qui est *Sa. australiensis*. Cependant l'hybridation ADN-ADN avec la même espèce de *Saccharothrix* a montré un pourcentage de 55,9% seulement. Ces résultats confirment l'originalité de la souche SA 233 et son appartenance à une nouvelle espèce laquelle a été nommée *Sa. algeriensis* (**Zitouni et al., 2004**). Elle a été déposée dans la banque d'Agriculture et Deutch sous les numéros d'accès NRRL B-24137 et DSM 44581 respectivement.

Aujourd'hui le taxon compte 22 espèces décrites, dont six ont été révélées au sein du laboratoire LBSM (Algérie) ; *Saccharothrix algeriensis* (**Zitouni et al., 2004**), *Sa. saharensis*, *Sa. hoggarensis* (**Boubetra et al., 2013**), *Sa. tamanrassetensis* (**Boubetra et al., 2015**), *Sa. isguenensis* sp. nov. (**Bouznada et al., 2016**) et *Sa. ghardaiensis* sp. nov. (**Bouznada et al., 2017**).

## Résultats et discussion

---

La souche SA 233 possède des propriétés antibactériennes et antifongiques intéressantes. L'action est particulièrement importante contre les bactéries à Gram positif, et faible à nulle contre les levures et les bactéries à Gram négatif. Cependant l'activité est très forte contre les champignons phytopathogènes en général. Des résultats similaires ont été obtenus avec les souches de *Saccharothrix* productrices d'antibiotiques tels que la formamicine (**Igarashi et al., 1997**) et les saccharomicines (**Singh et al., 2000**), montrant ainsi une très forte activité contre les bactéries à Gram positif et faible contre les bactéries à Gram négatif. L'activité antifongique est également importante avec certaines molécules produites par ce genre (**Igarashi et al., 1997**). Plusieurs travaux réalisés dans le monde ont montré que l'activité des molécules produites par les souches de *Saccharothrix* est surtout dirigée contre les bactéries à Gram positif, parfois contre les champignons et rarement contre les bactéries à Gram négatif (**Schumacher et al., 2002; Aouiche et al., 2012; Boubetra et al., 2013, 2015**).

La croissance de la souche *Saccharothrix* sp. SA 233, est caractérisé par le phénomène de diauxie avec la présence de deux phase exponentielles. Ce phénomène est généralement observé dans les milieux comportant deux sources de carbone osidique, ou bien une source de carbone et une source d'azote (**Strub, 2008; Prescott et al., 2013**). Dans la première phase, ce sont les acides aminés du milieu de culture qui sont utilisés comme source de carbone et d'azote avec une très faible consommation du glucose comme source d'énergie. Dans la seconde phase exponentielle), le glucose comme est utilisé comme source de carbone et d'énergie. Des croissances diauxiques ont été notés chez certaines souches de *Saccharothrix* (**Aouiche et al., 2012 ; Boubetra et al., 2013, Bouznada et al., 2017**).

Dans toutes les fermentations, le pH du milieu SS de la souche SA 233 est plus au moins stable. Plusieurs travaux ont rapporté que la présence du CaCO<sub>3</sub> dans le milieu SS joue un rôle de tampon. Il empêche les écarts importants et défavorables qui peuvent surgir sur la valeur du pH (**Igarashi et al., 1997; Lamari et al., 2002a, Strub, 2008**).

En général, la production des métabolites secondaires par les microorganismes se fait durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries cette production peut avoir lieu même en phase exponentielle (**Zitouni, 2005; Badji, 2006; Merrouche, 2012**). Concernant cette souche d'actinobactérie SA 233, nous avons noté que la production des molécules bioactives, a eu lieu au cours de toutes les phases de sa croissance, cependant les maxima de production sont notés durant les phases de déclin et stationnaire.

L'analyse de l'extrait brut obtenu à partir de la culture témoin par HPLC analytique a montré la production de six molécules d'antibiotiques. Les profils d'élution en HPLC, ont montré que l'ajout de précurseurs (acides organiques et acides aminés) augmente la

## Résultats et discussion

---

production de certaines antibiotiques sécrétées dans le milieu SS témoin et défavorise la production d'autres. On outre, ces précurseurs ont permis également l'apparition de nouveaux pics avec des temps de rétention différents de ceux produits dans le milieu témoin. Plusieurs chercheurs ont noté l'effet des sources de carbones et d'azote sur la production des antibiotiques (**Thakur et al., 2009; Abdelwahed et al., 2012; Souagui et al., 2015, Wang et al., 2017**).

Les antibiotiques sécrétés par la souche *Saccharothrix* SA 233, sont caractérisés par un noyau hétérocyclique de type 1,2-dithiolo-[4-3-b]-pyrrolo-5(4H)-one, correspondant à la famille des dithiopyrrolones. Ces antibiotiques sont connus déjà pour être sécrétés des actinobactéries appartenant aux genres *Streptomyces* seulement. Cependant, ils sont sécrétés par des bactéries (ex. *Xenorhabdus bovienii*, *X. luminescens* et *X. nematophilus* ou encore les bactéries marines (*Alteromonas rava*, *Photobacterium halotolerans* et *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 (**Celmer et Solomons, 1955, Furumai et al., 1982 McInerney et al., 1991, Webster et al., 2002 Murphy et al., 2011**)).

Les concentrations minimales inhibitrices ont montré que les bactéries à Gram positif sont majoritairement sensibles, contrairement aux bactéries à Gram négatif. Les champignons et les levures présentent une certaine sensibilité selon l'antibiotique utilisé. Cela, a été également constaté par plusieurs auteurs, qui ont signalé que l'activité des dithiopyrrolones est influencée par la nature du radical lié à l'azote n°7 (**Oliva et al., 2001; Li et al., 2007; Guo et al., 2008**).

## Conclusion et perspectives

Sur le plan taxonomique, la souche *Saccharothrix* SA 233 produit un mycélium aérien jaune à jaune orange, un mycélium du substrat jaune vif à jaune brunâtre et des pigments solubles de couleur jaune vif. Du point de vue physiologique, la souche SA 233 se rapproche de *Sa. australiensis* avec cependant certaines différences portant sur 8 tests d'utilisation de sources carbonées. L'analyse du séquençage de l'ADNr 16S a montré 98,8% de similitude avec *Sa. australiensis* (qui est l'espèce la plus proche) mais l'hybridation ADN-ADN avec cette espèce n'a donné que 55,9% de ressemblance. La souche SA 233 est donc différente de *Sa. australiensis* et de toutes les espèces de *Saccharothrix* connues dans le monde et représente ainsi une nouvelle espèce appelée *Saccharothrix algeriensis* (NRRL B-24137; DSM 44 581).

Ce qui concerne la production des antibiotiques par *Saccharothrix* SA 233, cette souche des antibiotiques appartenant à la famille des dithiopyrrolones. Ainsi, six molécules de dithiopyrrolones sont produites dans le milieu semi-synthétique témoin (sans précurseurs). L'ajout des acides organiques et aminés comme précurseurs au milieu SS à une concentration de 5 mM, a induit la production de nouveaux dérivés de dithiopyrrolones.

- L'addition de l'acide valérique a induit la production de trois nouvelles molécules (PR3, PR4 et PR7).

- L'addition de l'acide sorbique a permis l'apparition de cinq nouveaux produits (PR2, PR8, PR9, P10 et PR11).

- L'addition de l'acide cinnamique a permis l'apparition d'une nouvelle molécule (PR5).

- L'addition de la cystine a induit l'apparition de deux nouveaux produits (cyst1 et cyst2).

- L'addition de l'arginine a permis l'apparition de trois nouveaux produits (Arg2, Arg3 et Arg4).

Les structures chimiques de toutes les dithiopyrrolones ont été caractérisées, ce qui a permis d'identifier de nouvelles dithiopyrrolones.

A la fin de cette étude, nous pouvons dire que *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 étudiée est une actinobactérie prometteuse pour la production des antibiotiques à large spectre d'activité. Par ailleurs, les données toxicologiques sur les dithiopyrrolones sont très peu présentes dans la littérature bien qu'il semble que ce soit une limitation pour leur usage thérapeutique. Il serait donc important de déterminer pour chaque activité biologique des dithiopyrrolones, l'index thérapeutique des composés, c'est-à-dire le ratio entre la dose efficace et la dose toxique et de mener des études pharmacocinétiques.

## Références bibliographiques

**Abbas I.H. (2006).** A biological and biochemical studies of actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *Journal of Applied Sciences Research*, 10: 809-815.

**Abdelwahed N., Abdallah N. A., El-Ghawas D. E., El-Din S.M.B. & El-Diwany A.L. (2012).** Isolation, identification and optimization of antimicrobial metabolites produced by soil derived actinomycetes. *Egypt J Exp Biol (Bot).*, 8(2): 205–217

**Ait Barka E., Vatsa p., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y . & Wezel GP van. (2016).** *Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80: 1–43.

**Allali K., Goudjal Y., Zamoum M., Bouznada K., Sabaou N. & Zitouni A. (2019).** *Nocardiosis dassonvillei* strain MB22 from the Algerian Sahara promotes wheat seedlings growth and potentially controls the common root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00347>.

**Amin D.H., Abdallah N.A., Abolmaaty A., Tolba S. & Wellington E.M.H. (2020).** Microbiological and molecular insights on rare *Actinobacteria* harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre.*, 44(1).

**Amin D.H., Abdallah N.A., Abolmaaty A., Tolba S. & Wellington E.M.H. (2020).** Microbiological and molecular insights on rare *Actinobacteria* harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 5. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>

**Anandan R., Dharumadurai D. & Manogaran G.P. (2016).** An Introduction to *Actinobacteria*. In: *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, pp. 1-36.

**Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F., Lebrihi A. (2012).** *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 943–951. DOI: 10.10

**Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. & White R.P. (1985).** - Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 86-98.

**Badji B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.

**Bibb M.J. (2005).** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology.*, 8: 208–215

**Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P.C., Klenk H. P. & Sabaou N. (2013).** *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an *Actinomycete* isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63: 549–553

**Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P., Sabaou N. (2015).** *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1316–1320. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000104>

**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, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 177 p

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

- **Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006a).** Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 390-397.

**Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006b).** Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolones antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enz. & Microb. Tech.*, 39, 1423-429.

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

**Bouznada K. (2018).** *Saccharothrix* et genres apparentés des sols de la région du M'zab : isolement, taxonomie, mise en évidence de nouvelles espèces et production d'antibiotiques contre divers microorganismes pathogènes [Thèse de doctorat, l'école normale supérieure de Kouba, Alger].

**Bouznada K., Bouras N., Mokrane S., Chabane Chaouch F., Zitouni A., Pötter G., Spröer C., Klenk H.P. & Sabaou N. (2016).** *Saccharothrix isguensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 66: 4785–4790

**Bouznada K., Bouras N., Mokrane S., Chabane Chaouch F., Zitouni A., Pötter G., Spröer C., Klenk H.P. & Sabaou N. (2017).** *Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 110: 399–405

**Celmer W.D. & Solomons I.A. (1955).** The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinodithiole nucleus. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2861-2865.

**Celmer W.D., Tanner F.W., Harfenist M., Lees T.M. & Solomons I. A. (1952).** Characterization of antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 6304-6305.

**Chan T. & Aszalos A. (1987).** – TIC and UV-light spectrometry. *In: Modern analysis of antibiotic*. Aszalos A. (Ed.). Vol. 27. Marcel Dekker Inc, New York, p. 1982.

**Chavan V., Mulaje S. & Mohalkar R. (2013).** A Review on *Actinomycetes* and their biotechnological application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4 (5), 1730-1742.

**Chorin A.C. (2009).** - Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 238 p.

**Cole M. & Rolinson G.B. (1972).** Microbial metabolites with insecticidal properties. *Nematologia*, 42, 124-127 In: Webster et al., 2002.

**Delaunay S., Rondags E. & Germain P. (2003).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires. génie de la réaction chimique J6008(1-12).

**Dell I., Godfrey C.R.A. & Wadsworth D.J. (1992).** - Total synthesis of naturally occurring 1,2-dithiolo (4,3-b) pyrrolones and compounds. *American Chemical Society*, 384-394.

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

**Demain A.L. (2006).** From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33: 486–495.

**D.H. & Fleming I. (1989).** - Spectroscopic Methods in Organic Chemistry (fourth ed.), McGraw Hill, New York.

**Dhanasekaran D. & Jiang Y. (Éds.). (2016).** *Actinobacteria—Basics and Biotechnological Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/60457>

**Elbendary A.A., Hessain A.M., El-Hariri M.D., Seida A.A., Moussa I.M., Mubarak A.S., Kabli S.A., Hemeg H.A. & El Jakee J.K. (2018).** Isolation of antimicrobial producing *Actinobacteria* from soil samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 44-46. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>

**Furumai T., Takeda K. & Okanishi M. (1982).** - Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in the *Streptomyces kasugaensis*. *J. Antibiot.*, 35, 1367-1373.

**Gago G., Diacovich L., Arabolaza A., Tsai S.C. & Gramajo H. (2011).** Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 475-497. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00259.x>

**Guo Y., Chen G & Bin L. (2008)** Novel dithiopyrrolones and their therapeutical applications. Patent WO2008038175, 3 April 2008.

**Goodfellow M. & Cross T. (1984).** Classification. In: Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST, eds. *The Biology of the actinomycetes*. Academic Press, London, 7–164

**Gopalkrishnan K.S. & Jump J.A. (1952).** - The antibiotic activity of thiolutin in the chemotherapy of the Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology*, 42, 338-340.

**Goudjal Y., Zamoum M., Meklat A., Sabaou N., Mathieu F. & Zitouni A. (2016).** Plant-growth promoting potential of endosymbiotic *actinobacteria* isolated from sand truffles (*Terfezia leonis* Tul.) of the Algerian Sahara. *Annals of Microbiology*, 66, 91-100.

**Goodfellow M., Stanton L., Simpson K. & Minnikin D. (1990).** Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *Microbiology*. **136**: 19–36.

**Grund E. & Kroppenstedt R. (1990).** Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus

**Harvey A.L. (2008).** Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13: 894-901.

**Horvath G., Brazhnikova M.G., Konstantinova N.V., Tolstykh I.V. & Potapova N.P. (1979).** *The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic. J. Antibiot. (Tokyo)*, 32: 555–558.

**Igarashi M., Kinoshita N., Ikeda T., Nakagawa E., Hamada M. & Takeuchi T. (1997).** - Formamicin, a novel antifungal antibiotic produced by a strain of *Saccharothrix* sp. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J Antibiot.*, **50**, 926-931.

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

**Jose P. A. & Jha, B. (2016).** New dimensions of research on actinomycetes : quest for next generation antibiotics. *Front., Microbiol.*, **7**: 1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01295>

**Kavitha A. & Savithri H.S. (2017).** Biological significance of marine *Actinobacteria* of east coast of Andhra Pradesh, India. *Frontiers in Microbiology.*, **8**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01201>

**Khebizi N., Boudjella H., Bijani C., Bouras N., Klenk H.P., Pont F., Mathieu F. & Sabaou N. (2018).** Oligomycins A and E, major bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. strain HG29 isolated from a Saharan soil. *Journal de Mycologie Médicale*, **28**, 150-160.

**Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K. & Hopwood D. (2000).** *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.

**Kimura T., Nakamura K. & Takahashi E. (1995).** *Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by Saccharothrix sp. ST-888. II. structure determination. J. Antibiot. (Tokyo)*, 48: 1130–1133.

**Laassami A., Yekkour A., Meklat A., Djemouai N., Zitouni A., Mokrane S., Lecomte P., Rey P. & Berraf-Tebbal A. (2020).** *Actinobacteria* Associated with Vineyard Soils of Algeria: Classification, Antifungal Potential Against Grapevine Trunk Pathogens and Plant

**Labeda D.P., Hatano K., Kroppenstedt R.M. & Tamura T. (2001).** *Revival of the genus Lentzea and proposal for Lechevalieria gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 1045–1050.

**Labeda D.P. & Kroppenstedt R.M. (2000).** *Phylogenetic analysis of Saccharothrix and related taxa: proposal for Actinosynnemataceae fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 331–336.

**Labeda D.P., Testa R.T., Lechevalier M.P. & Lechevalier H.A. (1984).** - *Saccharothrix*: a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardioopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 426-431.

**Labeda D.P. & Kroppenstedt R.M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for Actinosynnemataceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Microbiology*, **50**, 331-336.

**Lahoum A. (2017).** Souches d'actinobactéries mycéliennes des sols sahariens: mise en évidence de nouvelles espèces et de nouveaux antibiotiques et réduction de la concentration en aflatoxine B1. Thèse de doctorat. École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 269 p.

**Lamari L. (2006).** - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat, E.N.S. de kouba, 176 p.

**Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. & Tillequin F. (2002a).** New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix sp.* SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **55**, 696-701.

**Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. & Tillequin F. (2002b).** - New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix sp.* SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **55**, 702-707.

**Larpent J.P. & Sanglier J.J. (1989).** – Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris, p. 481.

**Larpent-Gourgaud M. & Sanglier J.J. (1992).** – Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris.

**Lechevalier M.P., Bievre C.D. & Lechevalier H.A. (1977)** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: Phospholipid composition, *Biochimique Systématique Ecoogique* . **5** 249–260.

**Lechevalier M.P. & Lechevalier H. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20(4), 435-443. <https://doi.org/10.1099/00207713-20-4-435>

**Li B., Lyle MPA., Chen G., Li J., Hu K., Tang L., Alaoui-Jamali MA. & Webster J (2007)** Substituted 6-amino-4H-[1,2]dithiolo [4,3-b]pyrrol-5-ones: synthesis, structure–activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorgan Med Chem* 15: 4601–4608.

**Liu D., Coloe S., Baird R. & Pedersen J. (2000).** Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 471-471.

**Ludwing W., Euzéby J., Schumann P., Busse H. J., Trujillo M. E., Kämpfer P. & Whitman W. B. (2012).** Road map of the phylum *Actinobacteria*. In *Bergey's Manual Systématique Bacteriologique* ., Springer, New York, NY, pp. 1–28.

**Makkar N.S. & Cross T. (1982).** Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats. *Journal of Applied Bacteriology*, 52, 209-218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04842.x>

**Manucharova N. A., Yaroslavtsev A. M., Belova E. V. & Stepanov A. L. (9-15 July 2006).** The Role of Microbial Chitinoclastic Complex in Soil. [Congrès]. *Microbial Habitat: Evolution, Structure and Distribution in Soils*, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

**Martin J.F. (1979).** – Polyene macrolide antibiotics. *In: Economic Microbiology*. Rose A.F. (Ed.). Academic Press, London, pp. 355-387.

**Marwick J.D., Wright P.C. & Burgess J.G. (1999).** Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Marine Biotechnology*. 1: 495–507. <https://doi.org/10.1007/PL00011806>

**Mc Inerney B.V., Gregson R.P., Lacey M.J., Akhurst R.J., Lyons G.R., Rhods SH., Smith D.R.J., Engelhardt L.M. & White A.H. (1991).** Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotics activity. *J. Nat. Prod.*, 54, 774-784.

**McKenna F., EL-Tarabily K.A., Petrie S., Chen C. & Dell B. (2002).** Application of *Actinomycetes* to soil to ameliorate water repellency. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 107-112. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01136.x>

**Mechlinski W. (1978).** "The polyene antifungal antibiotics. *In: Handbook of microbiology.*" *Laskin A.I. and Lechevalier H.A. (Eds). CRC Press* 3: 93-107.

**Meklat A. (2004).** – Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'antracnose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 97p

**Mellouli L., Ameer-mehdi R., Ben Sioud S., Salem M. & Bejar S. (2003).** Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology*. 154: 345–352.

**Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje MC., Sabaou N. & 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. & 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

**Merrouche R. (2012).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture. Thèse de Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique. El-Harrach. 197 p.

**Merrouche R., Yekkour A., Lamari L., Zitouni A., Mathieu F. & Sabaou N. (2017).** Efficiency of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 and its Produced Antifungal Dithiolopyrrolones Compounds to Suppress *Fusarium oxysporum*-Induced Wilt Disease Occurring in Some Cultivated Crops. *The Arabian Journal for Science and Engineering*, 42, 2321–2327. DOI 10.1007/s13369-017-2504-4.

**Merrouche R., Yekkour A., Coppel Y., Bouras N., Zitouni A., Lebrihi A., Methieu F., Sabaou N. (2019).** A new dithiolopyrrolone antibiotic triggered by a long fermentation of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 in sorbic acid-amended medium, *Lett. Appl. Microbiol.* 69 , 294–301.

**Merrouche R., Yekkour A., Coppel Y., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F. and Sabaou N. (2020).** *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, the first non-*Streptomyces* actinobacterium, produces holomycin after cystine feeding. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01971-3>

**Murphy A.C., Fukuda D., Song Z., Hothersall J., Cox R.J., Willis C.L., Thomas C.M. & Simpson T.J . (2011).** Engineered Thiomarinol Antibiotics Active against MRSA Are Generated by Mutagenesis and Mutasynthesis of *Pseudoalteromonas* SANK73390. *Angewandte Chemie-International Edition* 50, 3271-3274

**Nakae K., Kurata I., Kojima F., Igarashi M., Hatano M., Sawa R., Kubota Y., Adachi H. & Nomoto A. (2013).** *Sacchathridine A*, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix sp.* *J. Nat.Prod.*, 76: 720–722.

**Nocardiopsis M. (1976).** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 40: 5–11.

**Normand P & Benson DR. (2012).** Order XVI *Frankiales*, p 508–510. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.*, 5.

**Oki T., Tenmyo., Hirano M., Tomatsu K. & Kamei, H. (1990).** Pradimicins A, B and C: new antifungal antibiotics. II. *In vitro* and *in vivo* biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 43: 763–770.

**Oliva B., O'Neill A., Wilson J.M., O'Hanlon P.J. & Chopra I. (2001).** - Antimicrobial Properties and Mode of Action of the Pyrrothine Holomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 532-539.

**Oskay M. & all. (2011).** Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces sp.*, KGG32. *International Journal of Agriculture & Biology*, **13**: 317–324.

**Ozbay N. & Newman S. E. (2004).** *Fusarium* crown and root rot of tomato and control methods. *Plant Pathology Journal*, **3**: 9-18

**Passari A.K., Mishra V.K., Saikia R., Gupta V.K. & Singh B.P. (2015).** Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic *Actinomycetes* associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology*, **6**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00273>

**Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H. & Fiedler H-P. (2000).** - Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, **80**, 135-142.

**Prescott L. M., Harley J. P. Klein D.A. (2002).** Microbiology, 5th edition. McGraw-Hill

**Prescott L.M., Willey J. M., Sherwood L. & Woolverton, C. J. (2013).** *Microbiologie*, 4ème édition. De Boeck Supérieur.

**Rawasheh R., Saadoun I. & Mahasneh A. (2005).** Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces sp.* (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *African Journal of Biotechnology*, **4**: 251-255.

**Reis I., Martins M.K., Carvalho C.M., Azevedo J.L. & Lima R.E. (2012).** The effect of varying culture conditions on the production of antibiotics by *Streptomyces spp.*, isolated from the Amazonian Soil. *Fermentation Technology*, **1**: 1-5.ds.

**Rouessac F. (1992).** – Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. Masson. Paris, 294 p.

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

**Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. & Bounaga N. (1992).** Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**, 1066–1073.

**Seneca H., Kane J.H. & Rockenbach J. (1952).** - Bacterial, protozoal and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot. Chemother.*, **2**, 375-360.

**Schachtner J.E., Nienaber J., Stachel HD. & Waisser K. (1999).** Fused 1,2-dithioles, V: Carbenoid anions as intermediates in reactions of pyrrothines and their heteroanalogues, *Pharmazie*, **54**, 335-340.

**Shirling E.B. & Gottlieb D.** (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16, 313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>

**Singh M.P., Petersen P.J., Weiss W.J., Kong F. & Greenstein M.** (2000). Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 2154–2159.

**Singh N. & Rai V.** (2012). Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4: 94–101.

**Solecka J, Zajko J, Postek M & Rajnisz A.** (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sciences*. 7: 373–390.

**Schumacher M. A., Bashor C. J., Song M. H., Otsu K., Zhu S., Parry R. J., Ullman B. & Brennan R. G.** (2002). The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 78–83

**Souagui Y., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C. & Kecha M.** (2015). Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces* sp. SY-BS5, using response surface methodology. *Journal of Medical Mycology*. 25: 108–115.

**Stahl P., Seidel H., Von der Eltz H., Wilhelms OH. & Roesch A.** (1988). - Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof, U. S. Patent 4,760,077.

**Stachel H.D., Eckla E., Immerz-Winklera E., Kreinera C., Wolfgang Weigand W., Christian Roblb C., Wünsch R., Dicke S. & Dreschere N.** (2002). Synthesis and Reactions of New Dithiopyrroles. *Helv. Chim. Acta*, 85, 4453-447.

**Strub C.** (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 203 p

**Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. & Suzuki Y.** (1994). Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 8, 122-127.

**Suzuki K., Sato T., Morioka M., Nagai K., Abe K., Yamaguchi H., Saito T., Ohmi Y. & Susaki K.** (1991). *Tetrazomine*, a new antibiotic produced by an actinomycete strain. *Taxonomy, fermentation, isolation and characterization*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 44: 479–485.

**Tata S., Aouiche A., Bijani C., Bouras N., Pont F., Mathieu F. & Sabaou N.** (2019). Mzabimycins A and B, novel intracellular angucycline antibiotics produced by *Streptomyces* sp. PAL114 in synthetic medium containing L-tryptophan. *Saudi Pharmaceutical Journal* ,27, 907-913

**Takahashi A., Hottan K., Saito O., Morioka M., Okami Y. & Umezawa H. (1986).** Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardioopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 39: 175–183.

**Taurino C., Frattini L., Marcone G.L., Gastaldo L. & Marinelli F. (2011).** *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin. *Microbial Cell Factor.*, 10(1): 82

**Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N. & Mazumdar S. (2009).** Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal of Medical Mycology*. 19: 161–167.

**Thakur D., Yadav A., Gogoi B. K. & Bora T. S. (2007).** Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of assam and tripura, india, for antimicrobial metabolites. *Journal of medical Microbiology*, 17: 242-249.

**Thiele-Bruhn S. (2003).** – Pharmaceutical antibiotic compounds in soils. A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166, 145-167.

**Toumatia O., Compant S., Yekkour A., Goudjal Y., Sabaou N., Mathieu F., Sessitsch A. & Zitouni A. (2016).** Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African Journal of Botany*, 105, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.020>

**van Dissel D. & van Wezel GP. (2017).** Morphology-driven downscaling of *Streptomyces lividans* to micro-cultivation. *Antonie van Leeuwenhoek.*: 1–13

**Von Daehne W., Godfredsen WO. & Tybring L. (1969).** New antibiotics containing the 1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole ring system. *J. Antibiot.*, 22, 233-236.

**Wadetwar RN., Chaturvedi JL., Building Z. & Road H. (2013).** Production of antibiotic from actinomycetes isolated from nagpur. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4: 3094– 3098.

**Wang L., Zhang M., Li Y., Cui Y., Zhang Y., Wang Z., et al. (2017).** Application of response surface methodology to optimize the production of antimicrobial metabolites by *Micromonospora* Y15. *Biotechnol Biotechnol Equip.*, 31(5): 1016–1025

**Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H. & Gao X. (2010).** Optimization of the fermentation process of *Actinomycete* strain Hhs.015. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010: 1–10.

**Wayne L., Brenner D., Colwell R. & al. (1987).** Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37: 463–464.

**Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E. & all (1987).** International

Committee on Systematic Bacteriology. Report the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463–464

**Webster J.M., Li J. & Chen G.** Anticancer property of dithiopyrrolones, U.S. Patent 6,020,360, 2000.

**Wink J., Mohammadipanah F. & Hamedi J.** (2017). *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1>

**Yadav A.N., Verma P., Kumar S., Kumar V., Kumar M., Sugitha T.C.K., Singh B.P., Saxena A.K. & Dhaliwal H.S.** (2018). *Actinobacteria* from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 13-41). Elsevier.

**Yassien M., Abdallah H., El-Halawany A. & Jiman-Fatani A.** (2015). Antituberculous activity of treponemycin produced by a *Streptomyces* Strain MS-6-6 Isolated from Saudi Arabia. *Molecules.*, 20: 2576-2590.

**Yekkour A., Meklat A., Bijani C., Toumatia O., Errakhi R., Lebrihi A., Mathieu F., Zitouni A. & Sabaou N.** (2015). A novel hydroxamic acid-containing antibiotic produced by a Saharan soil living *Streptomyces* strain. *Letters in Applied Microbiology*, 60, 589-596. <https://doi.org/10.1111/lam.12412>

**Zhi XY Li WJ. & Stackebrandt E.** (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **59**: 589–608.

**Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou. & Lebrihi A.** (2004b). – Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, **57**, 367-372.

**Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. & Labeda D.P.** (2004a). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**: 1377–1381.

**Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou. & Lebrihi A.** (2004b). – Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, **57**, 367-372.

**Zitouni A.** (2004). – Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardioopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 230 p.

## **Annexe**

### **1. Milieux d'identification des isolats d'actinobactéries**

#### **Milieu ISP1**

Tryptone: 5 g; extrait de levure: 3 g; agar: 18 g; eau distillée, q.s.p. 1000 mL; pH 7,2.

#### **Milieu ISP2**

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

#### **Milieu ISP3**

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

(\*) Solution saline standard: FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,1 g; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 0,1 g; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,1 g; eau distillée q.s.p. 100 mL.

#### **Milieu ISP4**

Amidon: 10 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g; MgSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O: 1 g; NaCl: 1 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g; CaCO<sub>3</sub>: 2 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2. Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL; agar: 20 g. pH 7,2.

#### **Milieu ISP 6**

Peptone: 20 g; citrate ferrique ammoniacal: 0,5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g; thiosulfate de sodium: 0,08 g; extrait de levure: 1 g; agar: 15 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

#### **Milieu ISP 7**

Glycérol: 15 g; L-tyrosine: 0,5 g; L-asparagine: 1 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O: 0,5 g; NaCl: 0,5g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,01 g; solution saline standard (voir ISP 3): 1 mL; agar: 18 g; eau distillée: q.s.p1000 ml. pH 7,2.

Milieu (SS) semi-synthétique :

ISP5 :

### **2. Milieux pour la production d'antibiotiques**

#### **Milieu semi-synthétique**

Le milieu synthétique (MS) de base contient (quantité pour 1000 ml): 2 g Na Cl; 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O; 2 g CaCO<sub>3</sub>; 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 10 g glucose et 20 g agar.