

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université de Blida 1**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département Biologie**

***Mémoire de fin d'étude***

En vue de l'obtention du diplôme de Master en  
Science de la nature et de la vie

**Option : Microbiologie**

**Thème**

**Effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la  
production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix  
algeriensis* NRRL B-24137**

**Soutenu le 14/07/2021**

**Présenté par :**

**Oussaadi Nawel**

**Zerrouk Besma**

**Devant le jury :**

**Mme Lounaci L.**

**M.C.B USDB 1**

**Présidente**

**Mme Mohamed Mahmoud F.**

**M.C.B USDB 1**

**Examinatrice**

**Mme Merrouche R.**

**M.C.A ENS**

**Promotrice**

**Promotion : 2020/2021**

## ***Remerciements***

Avant toute chose, A ***Allah*** nous rendons grâce, de nous avoir guidé et honoré pour la lumière de la compréhension et de nous avoir fait goûter la connaissance de la science.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. Il a été réalisé sous la direction du docteur Rabiaa Merrouche, Maître de Conférences à L'ENS de Kouba, auquel on tient à exprimer nos sincères remerciements et notre totale reconnaissance pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines ainsi que pour ses orientations et son appui prodigués durant cette étude, on la remercie de nous avoir fait confiance et d'avoir été présente aussi souvent que possible malgré ses tâches pédagogiques et administratives.

Nous remercions chaleureusement Mlle Yousfi Kheira, Maître Assistante à l'ENS de Kouba, pour sa contribution à ce travail de recherche, pour son aide précieuse, pour son soutien et sa gentillesse, pour nos nombreuses discussions scientifiques, pour ses encouragements et sa bonne humeur.

Nous exprimons nos vifs remerciements également à tous les membres du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) pour la dotation du matériel et pour leurs aides dans la réalisation des manipulations.

Nos sincères remerciements s'adressent également aux membres de jury, professeur Guetarni D., de nous avoir fait l'honneur d'avoir accepté la présidence du jury et docteur Mohamed Mahmoud F., pour avoir accepté d'examiner ce travail.

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

## ***Dédicace***

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,  
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien  
infaillible,*

*A mon binôme pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail, et à tous mes  
amis et camarades*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

***Nawel***

## *Dédicace*

*A mon cher papa*

*Mon bras droit et le pilier de ma vie, à celui qui m'a monté le chemin pour grandir, il m'a donné le courage et la force, sans lui rien ne serait possible.*

*A ma chérie maman*

*L'étoile qui illumine mon chemin, a celle qui m'a encouragé durant toutes mes études et qui sans elle ma réussite n'aura pas eu lieu.*

*Je vous remercie pour tous le soutien et l'amour que vous me porté depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagner toujours.*

*A la mémoire de mon grand-père Mustapha*

*J'aurais souhaité votre présence en ces moments pour partager ma joie, tu es toujours présent dans mon esprit et dans mon cœur.*

*A mon grand-père Amer et mes chéries grand-mères*

*Que dieux vous préserve santé et longue vie.*

*A ma sœur Amani et mes frères Bessem et Noah et mon rayon de soleil Mohamed Habibe.*

*A ma copine Khaoula*

*Avec qui j'ai partagé les plus beaux et difficiles moments, je remercie dieux de t'avoir connue.*

*A mes chers cousins et cousines, mes oncles et tantes.*

*A mon binôme Nawel que je remercie pour ça patience.*

*A tous mes amies de ma promotion.*

*Et à tous ceux que j'ai connus durant mon cycle d'étude.*

*Je dédié ce modeste travail accompagner d'un profond amour !*

*Besma*

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

INDEX DES FIGURES

INDEX DES TABLEAUX

RESUME

ABSTRACT

المخلص

INTRODUCTION GENERALE.....1

## CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. Les Antibiotiques.....</b>	<b>3</b>
1. Définition des antibiotiques.....	3
2. Classification des antibiotiques.....	3
3. Résistance aux antibiotiques .....	4
4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	6
4.1. Mécanismes enzymatiques.....	6
4.2. Mécanismes non enzymatiques.....	6
5. Recherche de nouveaux antibiotiques.....	7
5.1. Recherche par voie chimique.....	7
5.2. Recherche par voie naturelle.....	7
5.3. Importance des actinobactéries comme source d'antibiotiques.....	8
<b>II. Les Antibiotiques du Groupe des Dithiolyrrolones.....</b>	<b>8</b>
1. Classification des dithiolyrrolones.....	8
2. Microorganismes producteurs de dithiolyrrolones.....	9
3. Spectre d'action des dithiolyrrolones.....	12
4. Mode d'action des dithiolyrrolones.....	12
5. Intérêt des dithiolyrrolones.....	13
5.1. En agronomie.....	13
5.2. Dans d'autres domaines.....	14
6. Biosynthèse et synthèse chimique des dithiolyrrolones.....	15
6.1. Synthèse chimique des dithiolyrrolones.....	15
6.2. Biosynthèse des dithiolyrrolones .....	15
<b>III. Régulation de la biosynthèse des Dithiolyrrolones.....</b>	<b>17</b>
1. Régulation par la nature du milieu de culture.....	17
2. Régulation par les précurseurs .....	17
2.1. Influence des acides aminés.....	18
2.2. Influence des acides organiques.....	18
3. Régulation par voie enzymatique.....	19
<b>IV. La souche <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRI-B24137.....</b>	<b>19</b>
1. Origine de <i>Sa. algeriensis</i> .....	19
2. Caractéristiques et taxonomie de <i>Sa. algeriensis</i> .....	19
3. Spectre d'action de <i>Sa. algeriensis</i> .....	20
4. Les dithiolyrrolones sécrétés par <i>Sa. algeriensis</i> .....	21

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

<b>I. Matériel</b> .....	23
1. Souche de <i>Sa. algeriensis</i> .....	23
2. Souches de microorganismes cibles.....	23
3. Conservations des souches.....	23
4. Milieux de cultures.....	23
4.1. Milieux de conservation des microorganismes.....	24
4.2. Milieux du test d'antagonisme.....	24
4.3. Milieux de production d'antibiotiques.....	24
<b>II. Méthodes</b> .....	25
1. Activité antagoniste de <i>Sa. algeriensis</i> sur milieux solides.....	25
1.1. Méthodes des stries croisées.....	25
1.2. Méthodes des disques d'agar.....	26
2. Production des dithiopyrrolones en milieux liquides.....	27
2.1. Préparation des pré-cultures.....	27
2.2. Préparation des cultures.....	27
3. Mise en évidence de l'activité des dithiopyrrolones par la méthode des puits.....	28
4. Extraction des dithiopyrrolones.....	29
5. Antibiogramme.....	30

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

<b>I. Résultats</b> .....	32
1. Activité <i>in vitro</i> de <i>Sa. algeriensis</i> sur milieux solides.....	32
1.1. Méthodes des stries croisées.....	32
1.2. Méthodes des disques d'agar.....	34
2. Production des dithiopyrrolones sur milieux liquides.....	35
2.1. Mise en évidence des dithiopyrrolones par la méthode des puits.....	35
3. Extraction des dithiopyrrolones.....	37
3.1. Antibiogramme .....	37
<b>II. Discussion</b> .....	39
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	42
<b>Références bibliographiques</b> .....	43

### Annex

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>DTPs</b>	Dithiopyrrolones
<b>Ec</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Ef</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>Fg</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>graminearum</i>
<b>Foa</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>
<b>Foc</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>
<b>Fop</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>
<b>ISP2</b>	International <i>Streptomyces</i> Project 2
<b>LBSM</b>	Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
<b>Leu</b>	Leucine
<b>Lm</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Mal</b>	Acide malonique
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>MSS</b>	Milieu semi-synthétique
<b>MSSG</b>	Milieu semi-synthétique additionné de glucose
<b>MSS-L</b>	Milieu semi-synthétique + leucine
<b>MSS-M</b>	Milieu semi-synthétique+ acide malonique
<b>MSS-S</b>	Milieu semi-synthétique + acide sulfanilique
<b>MSS-Te</b>	Milieu semi-synthétique + témoin
<b>MSS-Ty</b>	Milieu semi-synthétique + tyrosine
<b>Pa</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar
<b>Sa</b>	<i>Saccharothrix</i>
<b>Sul</b>	Acide sulfanilique
<b>Te</b>	Témoin
<b>Ty</b>	Tyrosine
<b>rpm</b>	Rotation par minute

## INDEX DES FIGURES

Figure 1: Estimation du nombre de décès causé par la résistance aux antibiotiques chaque année dans le monde comparativement aux autres causes de décès (O’Neil, 2016).....	5
Figure 2: A La structure générale des dithiopyrrolones. B Les deux grandes familles des dithiopyrrolones.....	9
Figure 3: La synthèse chimique des dérivés des dithiopyrrolones (Qin <i>et al.</i> , 2013).....	16
Figure 4: Vue au microscope électronique à balayage des chaînes de spores de <i>Sa. algeriensis</i> croissance sur milieu ISP2, à 30°C pendant 10 jours (Zitouni <i>et al.</i> , 2004).....	20
Figure 5: Structure des DTPs produites par <i>Sa. algeriensis</i> . A produits dans le milieu de base sans précurseurs (Lamari <i>et al.</i> , 2002b), B produits après ajout de précurseurs (Merrouche <i>et al.</i> , 2010; Merrouche <i>et al.</i> , 2011; Merrouche <i>et al.</i> , 2019; Merrouche <i>et al.</i> , 2020).....	22
Figure 6: Schéma représentatif de la méthode des stries croisées.....	25
Figure 7: Mise en évidence de l’activité antimicrobienne de la souche d’actinobactérie par la méthode des cylindres d’agar.....	26
Figure 8: Préparation des pré-cultures de la souche <i>Sa. algeriensis</i> dans les milieux liquides MSS-Te, MSS-M, MSS-S, MSS-L et MSS-Ty.....	27
Figure 9: Préparation des cultures de la souche <i>Sa. algeriensis</i> dans les milieux liquides MSS-Te, MSS-M, MSS-S, MSS-L et MSS-Ty.....	28
Figure 10: Mise en évidence de l’activité antimicrobienne de la souche <i>Sa. algeriensis</i> sur milieu PDA et MH par la méthode de diffusion des puits.....	29
Figure 11: Protocole d'extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter.....	31
Figure 12: Test d’activité par antibiographie de la souche <i>Sa. algeriensis</i> contre <i>Foc</i> et <i>Lm</i> .....	31
Figure 13: Activité antagoniste de <i>Sa. algeriensis</i> contre les bactéries <i>Ec</i> , <i>Pa</i> , <i>Ef</i> et <i>Lm</i> par la méthode des stries croisées.....	33
Figure 14: Activité antagoniste de <i>Sa. algeriensis</i> contre les champignons <i>Foc</i> , <i>Foa</i> , <i>Fg</i> et <i>Fop</i> par la méthode des stries croisées.....	33
Figure 15: Activité antifongique de <i>Sa. algeriensis</i> contre le champignon <i>Foc</i> par la méthode des cylindres d’agar.....	34
Figure 16: Activité antibactérienne de <i>Sa. algeriensis</i> contre la bactérie <i>Lm</i> par la méthode de cylindre d’agar.....	35

Figure 17: Activité antifongique de <i>Sa. algeriensis</i> sur milieu MSS-Ty et MSS-Te liquides contre Foc au 5ème jour de la production des dithiopyrrolones.....	36
Figure 18: Activité antibactérienne de <i>Sa. algeriensis</i> sur milieu MSS-Ty et MSS-Te liquides contre Lm au 5ème jour de la production des dithiopyrrolones.....	37
Figure 19: Révélation par antibiographie des activités antimicrobiennes des extraits organiques obtenus des filtrats de culture des 5 milieux (MSS-Te, MSS-Ty, MSS-L, MSS-S et MSS-M), de <i>Sa. algeriensis</i> contre: Lm (en haut) et Foc (en bas).....	38

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification des antibiotiques selon leurs natures chimiques (Berdy <i>et al.</i> , 1987; Berdy, 2005).....	3
Tableau 2: Différents dithiopyrrolones sécrétés par les microorganismes (Saker, 2013; Merrouche <i>et al.</i> , 2020).....	10
Tableau 3: Exemples d'utilisation de la thiolutine dans le domaine agronomique.....	14
Tableau 4: Classification de <i>Sa. algeriensis</i> .....	20
Tableau 5: Liste des microorganismes cibles.....	23
Tableau 6: Activité antagoniste de <i>Sa. algeriensis</i> par la méthode des stries croisées.....	32
Tableau 7: Activité antagoniste de <i>Sa. algeriensis</i> par la méthode de cylindres d'agar.....	34
Tableau 8: Activité antimicrobienne des filtrats de culture de <i>Sa. algeriensis</i> , contre Lm et Foc au 5ème jour de la production par la méthode des puits.....	36
Tableau 9: Activité antimicrobienne des extraits organiques des filtrats de culture de la souche <i>Sa. algeriensis</i> vis-à-vis Foc et Lm.....	38

## RESUME

*Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 est une actinobactérie qui a été isolé à partir d'un sol saharien en Algérie. Cette souche produit plusieurs antibiotiques à activité fortement antifongique et antibactérienne et appartenant au groupe des dithiopyrrolones. Ce groupe est constitué par un bi-cycle contenant de l'azote et du soufre, ainsi que d'une chaîne latérale qui résulte d'un accolement d'un acide organique au noyau cyclique par une liaison amide. Cette souche produit dans un milieu semi-synthétique (à base de glucose et de levure), cinq molécules de dithiopyrrolones.

L'objectif du présent travail est, de voir l'effet de l'ajout des acides aminés (leucine et tyrosine) comme source d'azote et acides organiques (acide malonique et acide sulfanilique) comme source de carbone sur la production des dithiopyrrolones par la souche *Sa. algeriensis*.

Deux tests d'antagonisme ont été réalisés, pour évaluer les activités antimicrobiennes de *Sa. algeriensis* contre des bactéries à Gram positif, des bactéries à Gram négatif et des champignons. L'activité antagoniste maximale est notée contre la bactérie *Listeria monocytogenes* et le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Une production des dithiopyrrolones est réalisée pendant 5 jours dans les cinq milieux cités ci-dessus (MSS-témoin, MSS-leucine, MSS-Tyrosine, MSS-Malonique et MSS-sulfanilique). La mesure des activités antimicrobienne des cinq filtrats de culture est réalisée par la méthode de diffusion des puits. Les résultats ont montré que la tyrosine était la meilleure source d'azote, et que l'acide sulfanilique était la meilleure source de carbone.

A partir des filtrats de culture, les dithiopyrrolones produites sont extraites par le dichlorométhane, qui est considéré comme le meilleur solvant d'extraction pour ce groupe d'antibiotique. Les extraits bruts ont été testés par antibiographie, les zones d'inhibition été légèrement différentes et varie entre 45 mm et 55 mm contre *Listeria monocytogenes*, et entre 30 mm et 37 mm contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.

**Mots clés :** *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, dithiopyrrolones, acides organiques, acides aminés, antagonisme, production d'antibiotique, extraction.

## ABSTRACT

*Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 is an actinobacterium that has been isolated from Saharan soil in Algeria. This strain produces several antibiotics with strong antifungal and antibacterial activity and belonging to the dithiopyrrolones group. This group consists of 2 cycles containing nitrogen and sulfur, as well as a side chain that results from the attachment of an organic acid to the cyclic ring through an amide bond. This strain produces in a semi-synthetic medium (MSS: based on glucose and yeast), five molecules of dithiopyrrolones.

The objective of this work is to see the effect of adding amino acids (leucine and tyrosine) as a source of nitrogen and organic acids (malonic acid and sulfanilic acid) as a source of carbon, on the production of dithiopyrrolones by the strain *Sa. algeriensis*.

Two antagonism tests were performed to evaluate the antimicrobial activities of *Sa. algeriensis* against Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and fungi. The maximum antagonist activity is noted against the bacteria *Listeria monocytogenes* and the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Production of dithiopyrrolones is carried out for 5 days in the five media mentioned above (MSS-control, MSS-leucine, MSS-Tyrosine, MSS-Malonique and MSS-sulfanilique). The antimicrobial activities of the five culture filtrates are measured by the well diffusion method. The results showed that tyrosine was the best source of nitrogen, and sulfanilic acid was the best source of carbon.

From the culture filtrates, the produced dithiopyrrolones are extracted with dichloromethane, which is considered the best extraction solvent for this group of antibiotics. The crude extracts were tested by antibiography, the zones of inhibition were slightly different and varied between 45 mm and 55 mm against *Listeria monocytogenes*, and between 30 mm and 37 mm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

**Key words:** *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, dithiopyrrolones, organic acids, amino acids, antagonism, antibiotic production, extraction.

## الملخص

تم عزل سلالة الأكتينوبكتيريا *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 من تربة صحراوية في الجزائر. تنتج هذه السلالة العديد من المضادات الحيوية ذات النشاط القوي المضاد للفطريات والبكتيريا والتي تنتمي إلى مجموعة ثنائي كبريت البيروول Dithiopyrrolones. تتكون هذه المجموعة من حلقة ثنائية تحتوي على النيتروجين والكبريت، بالإضافة إلى سلسلة جانبية ناتجة عن ارتباط حمض عضوي بالنواة الحلقية من خلال رابطة أميد. تنتج هذه السلالة في وسط شبه اصطناعي (يعتمد على الجلوكوز والخميرة)، خمسة جزيئات من المضادات الحيوية ثنائي كبريت البيروول.

الهدف من هذا العمل هو معرفة تأثير إضافة الأحماض الأمينية (اللوسين Leucine والتيروزين Tyrosine) كمصدر للنيتروجين والأحماض العضوية (حمض المالونيك acide malonique وحمض السلفانيليك acide sulfanilique) كمصدر للكربون على إنتاج ثنائي كبريت البيروول بواسطة سلالة *Sa. algeriensis*.

تم إجراء اختبارين للتضاد لتقييم النشاط المضاد للميكروبات لسلالة *Sa. algeriensis* ضد البكتيريا موجبة الجرام والبكتيريا سالبة الجرام والفطريات. لوحظ أن أقصى نشاط تضادي كان اتجاه البكتيريا *Listeria monocytogenes* والفطر الممرض للنبات *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

يتم إنتاج ثنائي كبريت البيروول لمدة 5 أيام في الوسائط الخمسة المذكورة أعلاه (شاهد- MSS، MSS-leucine، MSS-Tyrosine، MSS-Malonique و MSS-sulfanilique). يتم قياس الأنشطة المضادة للميكروبات للمرشحات الوسائط الغذائية الخمسة بطريقة انتشار الأبار. أظهرت النتائج أن التيروزين كان أفضل مصدر للنيتروجين، وأن حمض السلفانيليك كان أفضل مصدر للكربون.

تم استخلاص المضادات الحيوية من المرشحات الخمسة بواسطة المذيب العضوي ثنائي كلورو ميثان، والذي يعتبر أفضل مذيب استخلاص لهذه المجموعة من المضادات الحيوية. تم اختبار المستخلصات الخام بواسطة تقنية antibiographie، وكانت مناطق التثبيط مختلفة قليلاً وتفاوتت بين 45 مم و 55 مم ضد *Listeria monocytogenes*، وبين 30 مم و 37 مم ضد *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

الكلمات المفتاحية: *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137، ثنائي كبريت البيروول، الأحماض العضوية، الأحماض الأمينية، النشاط التضادي، إنتاج المضادات الحيوية، الاستخلاص.

# **Introduction**

## INTRODUCTION

Au cours de ces dernières décennies, le monde de la santé a été marqué par une augmentation inquiétante du nombre de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques et par l'émergence de nouveaux agents pathogènes, encore plus dans les pays en voie de développement (Touati, 2006; Messai *et al.*, 2008). En Algérie, plusieurs travaux publiés ont signalé l'apparition de souches bactériennes résistantes ou multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés (Ayad *et al.*, 2016; Yagoubat *et al.*, 2017; Brahmi *et al.*, 2018). Pour résoudre la crise des antibiotiques, la découverte de nouveaux composés provenant de diverses sources naturelles, comme les micro-organismes, occupe une place de choix au sein des programmes de recherche mondiaux avec la perspective de la mise au point de nouveaux médicaments (Kat et Baltz., 2016; Genilloud, 2019; Abdel-Razek *et al.*, 2020).

Les actinobactéries sont parmi les microorganismes les plus intéressants dans la production d'antibiotiques naturels, avec près de 50% de molécules sécrétées à structures chimiques très diversifiées et dont plusieurs sont utilisés dans les domaines thérapeutique, vétérinaire et agronomique (antibactériens, antifongiques, antitumoraux, etc.) (George *et al.*, 2012; Solecka *et al.*, 2012; Manivasagan *et al.*, 2013; Hug *et al.*, 2018). Pour accroître les chances de découverte de nouveaux antibiotiques, la piste de l'exploration d'isolats d'actinobactéries rares (autres que les streptomycètes) provenant d'écosystèmes particuliers et sous-explorés a contribué à l'augmentation du nombre de nouveaux genres producteurs de composés néobioactifs (Djinni *et al.*, 2019).

*Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 est une actinobactérie isolée à partir d'un sol saharien de la palmeraie d'Adrar (Zitouni *et al.*, 2004). Cette espèce, appartenant au groupe des actinobactéries dit « rares », s'est avérée être productrice de plusieurs molécules de la famille des dithiopyrrolones possédant des activités antibiotiques et anticancéreuses intéressantes (Webster *et al.*, 2000 Webster *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2001; Lamari *et al.* 2002b; Pelechano and Pérez-Ortín, 2008). *Sa. algeriensis* produit dans un milieu semi-synthétique (MSS), cinq molécule de dithiopyrrolones (Lamari *et al.* 2002b). L'ajout des acides organique et aminés comme précurseurs au milieu SS, a induit la production de nouveaux dérivés de dithiopyrrolones (Bouras, 2005; Merrouche, 2012).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de quelques sources de carbone (acides organiques) et d'azote (acides aminés) sur la production des dithiopyrrolones par la souche de *Sa. algeriensis*. Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectifs les points suivants :

- Effectuer un test d’antagonisme de *Sa. algeriensis* contre des germes cibles, sur deux milieux solides: PDA pour l’activité antifongique et Mueller Hinton pour l’activité antibactérienne.
- Etudier la production et l’extraction des dithiopyrrolones sur cinq milieux différents : milieu SS basal (témoin) et quatre milieux SS additionné de précurseurs correspondant (2 acides organiques : acide malonique et sulfanilique et 2 acides aminés : tyrosine et leucine). Les extraits bruts obtenus sont testés pour leur activité antimicrobienne par antibiographie.

Ce mémoire est présenté en trois parties :

- ✓ La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique détaillée sur les antibiotiques en général et sur la famille des dithiopyrrolones en particulier. Nous avons présenté leur classification, leur mode d’action et leur importance dans les différents domaines, avec un intérêt particulier consacré à la régulation de leur biosynthèse. Dans cette partie des généralités sur la souche d’actinobactérie *Sa. algeriensis* sont également données.
- ✓ La deuxième partie est réservée à la présentation de matériel et la description des méthodes utilisées.
- ✓ La troisième partie est consacrée aux résultats obtenus et à leurs discussions.

# **Chapitre 1**

## **Synthèse Bibliographique**

## I. LES ANTIBIOTIQUES

### 1. Définition des antibiotiques

Le terme d'antibiotique vient du grec « bios » qui signifie la vie et « anti » qui signifie contre. Il désigne toute substance d'origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique qui, même à très faibles concentrations, inhibe ou tue certains microorganismes, et possédant une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte (Singleton, 1994, Van Bambeke et Tulkens, 2008). Les antibiotiques peuvent être produits par des microorganismes, des plantes ou même des animaux (Breton *et al.*, 1989 ; Sanglier, 1993).

### 2. Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques s'effectue selon plusieurs critères : l'origine (naturel, synthétique ou semi synthétique), spectre d'action (large ou étroit), leur mode d'action et la nature chimique, qui est la plus utilisée, et permet de classer les antibiotiques en groupes homogènes séparées par leur objectif clinique. Neuf grandes familles d'antibiotiques ont été proposées par Berdy *et al.* (1987) et Berdy (2005) sur la base de leur structure chimique, le tableau ci-dessous regroupe ces familles.

**Tableau 1:** Classification des antibiotiques selon leurs natures chimiques (Berdy *et al.*, 1987; Berdy, 2005).

Familles d'antibiotiques	Sous-familles	Exemple
<b>Glucides et apparentés</b>	Glucides purs	Nojirimycine.
	Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, kanamycine.
	Glycosides	C-glycosides : vancomycine. N-glycosides : streptothricine.
	Glycolipides	Moenomycine.
<b>Lactones macrocycliques</b>	Macrolides	Spiramycine, érythromycine.
	Macrotétrolides	Tetranactine, nonactine.
	Polyènes	Amphotéricine, nystatine, candicidine.
	Macrolactames	Rifamycine.

<b>Quinones et apparentés</b>	Polycycliques accolés linéairement	Tétracyclines.
	Dérivés naphtoquinoniques	Anthracyclines.
	Dérivés benzoquinoniques	Mitomycine.
<b>Acides aminés et peptides</b>	Dérivés d'acides aminés	Cyclosérine, pénicilline, nocardicine.
	Homopeptides	Bacitracine, cyclosporine.
	Hétéropeptides	Aculéacine.
	Depsipeptides	Valinomycine.
<b>Hétérocycles à azote</b>	Hétérocycles non accolés	Caerulomycine, mildiomyce.
	Hétérocycles accolés	Phénazines, herbicidine.
<b>Hétérocycles à oxygène</b>	Polyéthers	Monensine, nigéricine.
<b>Composés alicycliques</b>	Dérivés du cycloalcane	Cycloheximide.
	Terpènes	Acide marasmique.
	Oligoterpènes	Acide fusidique.
<b>Composés aromatiques</b>	Dérivés benzéniques	Chloramphénicol.
	Aromatiques accolés	Griséofulvine.
	Composés non benzéniques	Fusariocine.
	Autres dérivés aromatiques	Novobiocine.
<b>Composés aliphatiques</b>	Dérivés des alcanes	Élaiomycine.
	Dérivés d'acides carboxyliques	Cérolénine.
	Composés contenant du phosphore ou du soufre	Fosfomycine.

### 3. Résistance aux antibiotiques

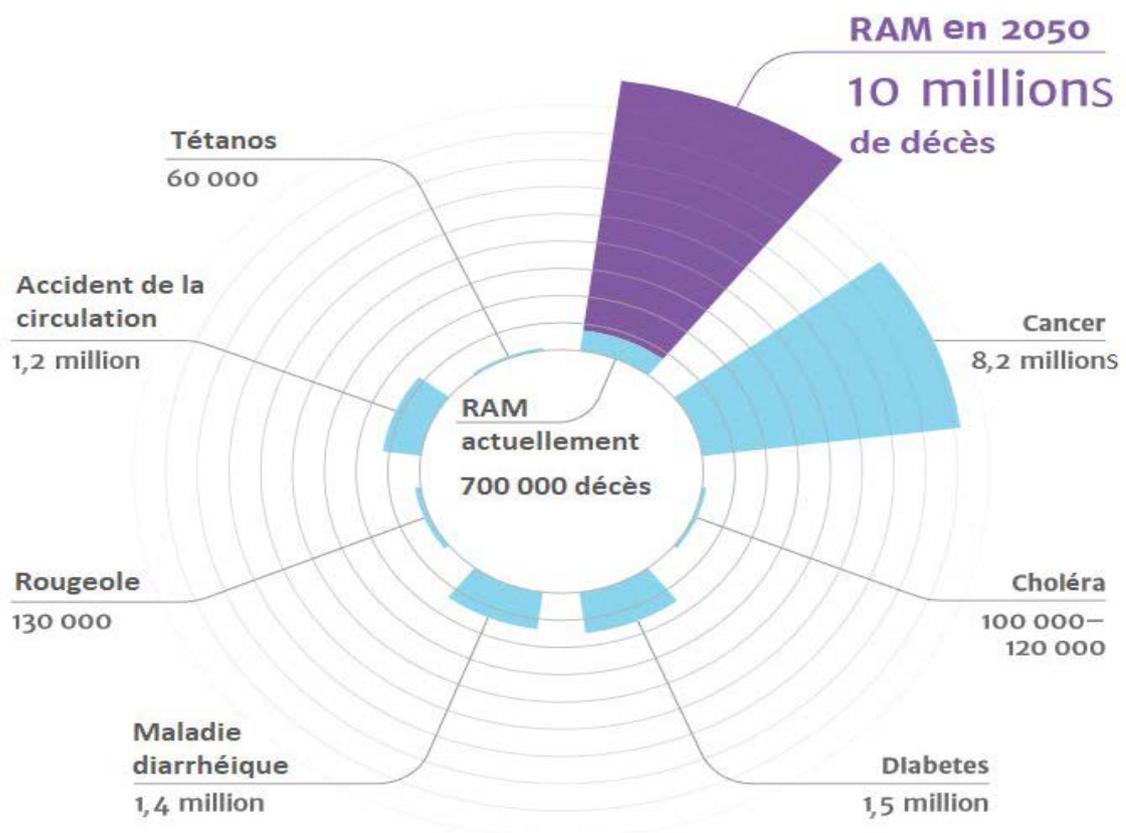
L'efficacité d'un antibiotique repose sur sa capacité de rentrer en contact avec la bactérie et de pénétrer dans la cellule. Son effet consiste à perturber le fonctionnement du microorganisme, en se fixant à une cible sans être détruit, ou modifié (Collignon *et al.*, 2016).

La résistance aux antibiotiques est donc le pouvoir d'un microorganisme à rendre un antibiotique inefficace. Cependant, le mauvais usage de ces agents antimicrobiens et leur utilisation accrue, ont eu pour conséquence de faire apparaître certaines formes de résistances des souches microbiennes contrebalançant les effets des antibiotiques. Les microorganismes

pathogènes, grâce à leur flexibilité et plasticité génétique, sont capables de mettre en place un programme de résistance spécifique contre un antibiotique particulier. En effet, certaines souches arrivent à rétablir une multi-résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les microorganismes multi-résistants aux antibiotiques (multidrug resistant ou MDR).

La résistance microbienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelle (intrinsèque) et acquise (due à des modifications dans le profil d'expression génique). La première est programmée au niveau du pool génomique, alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques (Bouyahya *et al.*, 2017).

Le problème de la multi-résistance a réellement pris de l'ampleur récemment au regard du nombre croissant de décès, selon O'Neil (2016), d'ici à 2050, ce nombre pourrait être très élevé (Figure 1), même s'il est impossible de prédire l'évolution de la résistance aux antibiotiques.



**Figure 1:** Estimation du nombre de décès causé par la résistance aux antibiotiques chaque année dans le monde comparativement aux autres causes de décès (O'Neil, 2016).

RAM : Résistance aux antimicrobiens.

**Note :** le nombre de décès dû à la résistance microbienne aux antibiotiques est donné en comparaison avec le nombre de décès dû au diabète, au cancer, à d'autres pathologies et aux accidents de circulation.

#### 4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Il s'agit d'une résistance qui peut être naturelle (intégré dans le chromosome) ou acquise, selon les bactéries (via des mutations spontanées au niveau du chromosome : 20% des cas ou par le biais des éléments génétiques, les plasmides et les transposons : 80% des cas) (Ghannoum et Rice, 1999; Maltezou, 2008). La résistance naturelle aux antibiotiques est connue par exemple chez les bactéries anaérobies et les mycoplasmes résistants aux aminosides et aux  $\beta$ -lactamines (Maltezou, 2008).

Lorsqu'il y a résistance, quel que soit l'origine, celle-ci résulte de deux principaux mécanismes : enzymatiques et mécanismes non-enzymatiques.

##### 4.1. Mécanismes enzymatiques

Les mécanismes enzymatiques se reposent sur la synthèse des enzymes par les microorganismes, qui sont capables de modifier l'antibiotique le rendant inefficace, soit par transfert de groupements chimiques ou par oxydoréduction. Parmi ces enzymes, nous pouvons citer l'aminoside phosphotransférase, la chloramphénicol acétyltransférase et les  $\beta$ -lactamases qui agissent sur les aminosides, les phénicolés et les  $\beta$ -lactamines respectivement (Cavallo *et al.*, 2004; Touati *et al.*, 2006).

##### 4.2. Mécanismes non enzymatiques

En ce qui concerne les mécanismes non enzymatiques, ils reposent sur les facteurs suivants :

- Modification de la perméabilité membranaire : à raison des modifications au niveau des porines (canaux centraux livrant un passage aux molécules hydrophiles de petite taille telles que les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les phénicolés), causées par des mutations chromosomiques ou plasmidiques. Ce mécanisme est à l'origine d'une résistance acquise à plusieurs familles d'antibiotiques (Cavallo *et al.*, 2004; Choi et Lee, 2019).
- Résistance par efflux actif : Il s'agit d'un système d'exportation de l'antibiotique en dehors de la bactérie. Il s'agit d'un mécanisme actif, la bactérie synthétise des protéines d'export qui vont emporter l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie. Ainsi il ne peut pas se fixer à sa cible et est inefficace (Poole, 2005).
- Résistance par modification de la cible : Il existe différents mécanismes de modification de la cible de l'antibiotique. Tout d'abord, la modification structurelle de la cible entraînant une perte d'affinité dans le couple cible-antibiotique. L'antibiotique ne pouvant pas se fixer correctement à sa cible, son action sera limitée (Geslin *et al.*, 1992). Cette résistance s'étend souvent à tous les antibiotiques de la même famille que celle de l'antibiotique étudié (Fauchere, 2002; Cavallo *et al.*, 2004).

- Formation des biofilms : De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical (Rizzato *et al.*, 2019). Cette résistance, accrue et multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène, etc.). Ces conditions modifient les propriétés physiologiques des microorganismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques, qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus (Azman *et al.*, 2019). La résistance élevée des biofilms aux agents antibactériens pourrait également reposer sur la présence d'une sous-population de bactéries capables de résister à de fortes concentrations (Lewis, 2008).

## **5. Recherche de nouveaux antibiotiques**

Les solutions envisagées dans le cadre de la lutte contre la résistance aux antibiotiques reposent sur la recherche de nouveaux antibiotiques par voie biologique (naturelle), chimique, hémisynthèse (modifications chimiques des molécules existantes), ou encore par mutasynthèse, c'est-à-dire, en fournissant à la bactérie des intermédiaires métaboliques différents (Genilloud, 2017).

### **5.1. Par voie chimique : synthèse et hémisynthèse**

La synthèse chimique ou l'hémisynthèse d'un antibiotique, consiste à développer des dérivés de cet antibiotique, de façon à avoir des molécules plus actives, soit en modifiant la molécule d'origine de manière à la faire agir sur une cible légèrement différente, soit en lui adjoignant un inhibiteur de mécanisme de résistance lorsque celui-ci est connue. Dans ce domaine-là, c'est les antifongiques de synthèse qui sont les plus répandus. Le meilleur exemple est celui des dérivés des triazolés tels que le posaconazole, le ravuconazole ou le voriconazole (Maillié et Bastide, 2001). A l'heure actuelle, vu la complexité des molécules antibiotiques, les méthodes purement chimiques ne sont pas économiquement rentables. La voie biologique reste la voie principale de synthèse de la plupart des antibiotiques (Joffin et Leyral, 2006).

### **5.2. Par voie naturelle**

Les antibiotiques naturels sont des métabolites secondaires dérivés d'organismes vivants, tels que les plantes, les animaux et les microorganismes (Baker *et al.*, 2000). Parmi ces molécules naturelles, les antibiotiques d'origine microbienne ont suscité la découverte de la plupart des classes d'antibiotiques et d'antifongiques actuellement utilisées en clinique, et continuent toujours d'être la source de molécules et de structures originales (Genilloud, 2019).

Il est à noter que beaucoup d'études se concentrent sur l'amélioration des rendements de la production des molécules déjà existantes. La technique utilisée est l'ingénierie métabolique qui consiste soit à rediriger les flux de précurseurs métaboliques vers la production de la molécule d'intérêt, soit à déréguler certaines voies métaboliques ou alors à surexprimer les enzymes impliquées dans les étapes métaboliques-clés (Olano *et al.*, 2008). D'autres techniques utilisent des hôtes hétérologues pour l'expression des métabolites secondaires. Ainsi, l'échinomycine (composé antitumoral) a été produites à partir d'*Escherichia coli* par expression du cluster de gènes isolés à partir de *Streptomyces lasaliensis* (Mori *et al.*, 2017).

### 5.3. Importance des actinobactéries comme source d'antibiotiques

Les actinobactéries représentent un groupe abondant de microorganismes largement répandus dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Elles sont connues pour leur grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales induisant de fait une grande variabilité métabolique (Bawazir et Shantaram., 2018). En effet, elles produisent une vaste gamme de composés (des pesticides, des herbicides, des insecticides, des immunosuppresseurs, des antitumoraux, etc.), dont les antibiotiques qui ont montré une grande importance clinique et commerciale (Oskay *et al.*, 2004; Parungao *et al.*, 2007; Dilip *et al.*, 2013; Lo Grasso *et al.*, 2016; Robertsen et Musiol-Kroll., 2019).

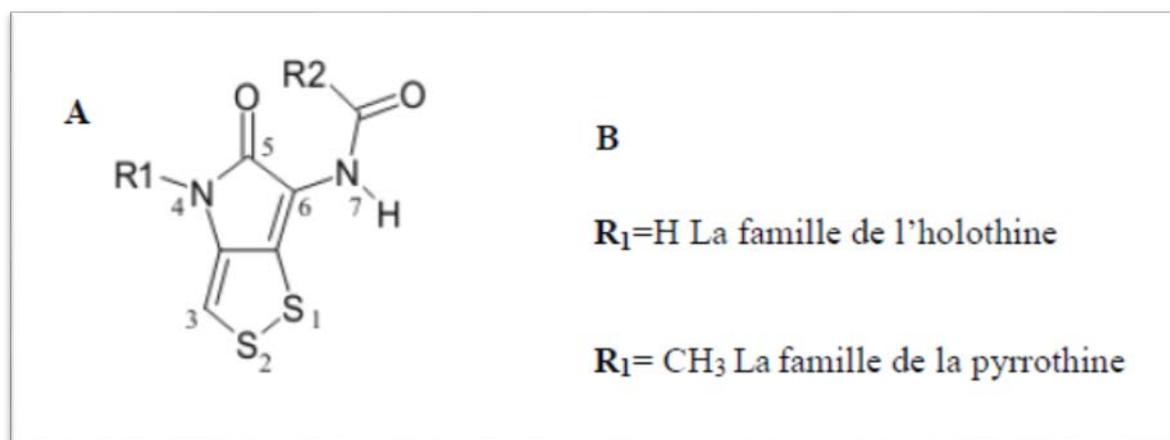
Dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les chercheurs ont commencé à s'intéresser ces dernières années à des genres d'actinobactéries rares provenant de milieux extrêmes (Boubetra *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Driche *et al.*, 2015; Djaballah *et al.*, 2018 ; Khebizi *et al.*, 2018; Lahoum *et al.*, 2019; Djinni *et al.*, 2019). Ces actinobactéries rares disposent d'un système enzymatique et d'un métabolisme particulier leur permettant de produire des métabolites secondaires originaux dont les antibiotiques. En effet, cette fraction d'actinobactéries s'est révélée être une source potentielle d'antibiotiques et plusieurs nouvelles molécules ont été mises en évidence chez des genres rares ou peu fréquents, tels que les thiazomycines (Junker *et al.*, 2009) et de la pargamycine A (Hashizume *et al.*, 2010), élaborées par des espèces d'*Amycolatopsis*, ainsi que les polyketides polycycliques sécrétés par *Verrucosipora maris* (Roh *et al.*, 2011).

## II. LES ANTIBIOTIQUES DE GROUPE DES DITHIOLOPYRROLONES

### 1. Classification des dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones (DTPs) sont des molécules caractérisées par la présence d'un noyau de type 1,2-dithiolo-[4,3-*b*] pyrrol-5(4H) -one. Ils possèdent une structure hétérocyclique composée de deux cycles ; un cycle pyrole qui contient des radicaux reliés à

l'azote n° 4 et à l'azote n° 7 et un cycle dithiole (contenant deux atomes de soufre). Les DTPs sont subdivisées en deux grandes familles, selon la nature du groupement lié à l'azote n° 4 : la famille de la pyrrothine avec un groupement CH<sub>3</sub> et la famille de l'holothine avec un atome d'hydrogène H (Stachel *et al.*, 2002). Les différents dérivés qui se trouvent dans chaque famille, diffèrent dans la nature du radical porté par l'azote n° 7 (ex. thiolutine, holomycine, tigloyl-pyrrothine, sénéciol-pyrrothine, butanoyn-pyrrotine, etc) (Li *et al.*, 2014).



**Figure 2 :** A La structure générale des dithiopyrrolones. B Les deux grandes familles des dithiopyrrolones.

## 2. Microorganismes producteurs de dithiopyrrolones

La première molécule de DTP identifiée à la thiolutine, a été produite par l'actinobactérie *Streptomyces albus*, sa structure chimique a été déterminée pour la première fois par [Celmer et Solomons en 1955](#). Plusieurs autres dérivés de DTPs ont été produit par d'autres microorganismes, parmi lesquels existent des bactéries non mycéliennes comme *Xenorhabdus bovienni*, *Xenorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus nematophilus*, ou encore des bactérie marine telle que *Photobacterium halotolerans*, *Photobacteium halotolerans* S2753 et *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 productrices de l'holomycine et *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 productrice de thiomarinoles et xenorhabdines ([Webster \*et al.\*, 2002](#); [Wietz \*et al.\*, 2010](#); [Murphy \*et al.\*, 2011](#); [Qin \*et al.\*, 2013](#); [Zhai \*et al.\*, 2016](#))

Des travaux réalisés par [Lamari \*et al.\* \(2002b\)](#), ont montré la production des DTPs dans le milieu ISP2 par une souche d'actinobactérie autre que le genre *Streptomyces*, nommée *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Par la suite, d'autres études ont montré que cette souche d'actinobactérie possède une grande capacité à produire un grand nombre de dérivés

de DTPs selon la nature de milieu de culture, ainsi 20 dérivés de DTP ont été sécrétés dans un milieu semi-synthétique liquide supplémenté par des acides organiques ou des acides aminés. Parmi ces dérivés, 10 molécules ont été identifiées et caractérisées (Bouras *et al.* 2008; Merrouche *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*,2011; Merrouche *et al.*,2019; Merrouche *et al.*,2020). Une liste de toutes les dithiopyrrolones naturelles connues actuellement, ainsi que leur formule chimique, leur poids moléculaire et les microorganismes producteurs est donnée dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Différents dithiopyrrolones sécrétés par les microorganismes (Saker, 2013; Merrouche *et al.*, 2020)

Dithiopyrrolones	Formule et PM	Espèces productrices
Pyrrothine	$C_6H_6N_2OS_2$ <b>PM: 186</b>	<i>Streptomyces sp.</i>
Thiolutine ( <i>syn.</i> : acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine).	$C_8H_8N_2O_2S_2$ <b>PM: 228</b>	<i>Streptomyces thioluteus</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. kasugaensis</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Auréothricine ( <i>syn.</i> : propionyl-pyrrothine, propio-pyrrothine).	$C_9H_{10}N_2O_2S_2$ <b>PM: 242</b>	<i>Streptomyces kasugaensis</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. farcinicus</i> , <i>S. thioluteus</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. cyanoflavus</i> .
Iso-butyryl-pyrrothine ( <i>syn.</i> : iso-butyro-pyrrothine, 2-méthylpropanoyl-pyrrothine).	$C_{10}H_{12}N_2O_2S_2$ <b>PM: 256</b>	<i>Streptomyces pimprina</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Xénorhabdine VII ( <i>syn.</i> : butanoyl-pyrrothine, butyro-pyrrothine).	$C_{10}H_{12}N_2O_2S_2$ <b>PM: 256</b>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Sénécioyl-pyrrothine ( <i>syn.</i> : 3-méthyl-2-butanoyl-pyrrothine).	$C_{11}H_{12}N_2O_2S_2$ <b>PM: 268</b>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Tigloyl-pyrrothine	$C_{11}H_{12}N_2O_2S_2$ <b>PM: 268</b>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .

Benzoyl-pyrrothine	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 290</b>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Xénorhabdine VI (syn.: 3-methyl-butanoyl-pyrrothine).	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 270</b>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .
Xénorhabdine IV (syn.: hexanoyl- pyrrothine).	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 284</b>	<i>Xenorhabdus</i> spp.
Penténoyl-pyrrothine	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 284</b>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
iso-hexanoyl-pyrrothine	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 284</b>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Xénorhabdine V (syn.: 5-methylhexanoyl-pyrrothine).	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 298</b>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .
Holomycine (syn.: déméthyl-thiolutine).	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 214</b>	<i>Streptomyces</i> sp. P6621, <i>S. griseus</i> , <i>S. clavuligerus</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>Photobactérie halotolerans</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Pseudoalteromonas</i> sp, <i>Sa. algeriensis</i> , <i>S. clavuligerus</i> , <i>Photobactérie halotolerans</i> S2753, <i>Yersinia ruckeri</i> .
Propionyl-holothine	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 228</b>	<i>Streptomyces</i> P6621 (et aussi synthétisé chimiquement).
Xénorhabdine I (syn.: hexanoyl-holothine).	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 270</b>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .
Xanthidrol (dérivé de la Xénorhabdine I).	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 450</b>	Transformation chimique de la Xénorhabdine I.
Xénorhabdine II (syn.: 5-methylhexanoyl-holothine).	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 284</b>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .
Xénorhabdine III (syn.: octanoyl-holothine).	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 298</b>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> .
Thioaurine (syn.: orosomycine ou antibiotique VD 844)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <b>PM: 214</b>	<i>Streptomyces</i> sp.

Antibiotique VD 846	$C_6H_4N_2O_2S_2$ <b>PM: 200</b>	<i>Streptomyces</i> sp.
Thiomarinole A	$C_{30}H_{44}N_2O_9S_2$ <b>PM: 640</b>	<i>Alteromonas rava</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> sp.
Thiomarinole B	$C_{30}H_{44}N_2O_{11}S_2$ <b>PM: 672</b>	<i>Alteromonas rava</i> .
Thiomarinole C	$C_{30}H_{44}N_2O_8S_2$ <b>PM: 624</b>	<i>Alteromonas rava</i> .
Thiomarinole D	$C_{31}H_{46}N_2O_9S_2$ <b>PM: 654</b>	<i>Alteromonas rava</i> .
Thiomarinole E	$C_{32}H_{48}N_2O_9S_2$ <b>PM: 668</b>	<i>Alteromonas rava</i> .
Thiomarinole F	$C_{30}H_{42}N_2O_9S_2$ <b>PM: 638</b>	<i>Alteromonas rava</i> .
Thiomarinole G	$C_{30}H_{44}N_2O_8S_2$ <b>PM: 624</b>	<i>Alteromonas rava</i> .

### 3. Spectre d'action des dithiopyrrolones

Le spectre d'action des différents dérivés de DTPs dépend de la nature des radicaux variables R1 et R2 reliés à l'azote n° 4 et à l'azote n° 7 du cycle pyrrole. Ce spectre est très large, il touche aussi bien les bactéries à Gram positif (ex. *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*) et à Gram négatif (ex. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), les levures (ex. *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*), les champignons microscopiques (ex. *Penicillium* sp., *Aspergillus carbonarius*, *Alternaria* sp., *Fusarium graminearum*) et même les protozoaires et les insectes (Webster *et al.*, 2002, Lamari *et al.*, 2002b, Merrouche *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2011; Merrouche *et al.*, 2020). De plus, les DTPs peuvent présenter des activités antiallergique (Stahl *et al.*, 1988), protozoicides, larvicides et insecticides (Šturdíková *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 2002), antihistaminiques (Minamiguchi *et al.*, 2001) et anti-tumorale (Webster *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2014). Cependant, l'utilisation des dithiopyrrolones dans la lutte contre les bactéries infectieuses est limitée par leur forte toxicité (Niemi, 1995).

### 4. Mode d'action des dithiopyrrolones

Les dérivés des DTP et en particulier, la thiolutine et l'holomycine, ont fait l'objet de plusieurs études quant à leur mode d'action. L'action de la thiolutine a été démontrée chez

plusieurs procaryotes, tels que *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus* (Sivasubramanian et Jayaraman, 1976; Joshi *et al.*, 1982; O'Neill *et al.*, 2000) et chez les eucaryotes comme *Saccharomyces cerevisiae* (Lee *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 2002). Plusieurs modes d'action ont été notés, nous citons principalement les suivants :

- Inhibition de l'ARN messager et la synthèse des protéines, la thiolutine, à des concentrations qui varient entre 5 et 40 µg/mL, inhibe la synthèse de la β-galactosidase et l'élongation de l'ARN messager (Khachatourians et Tipper, 1974a, b). La synthèse de l'ARNm chez *Saccharomyces cerevisiae* est bloquée immédiatement, et d'une façon irréversible, à des concentrations entre 2 et 4 µg/mL et le blocage de la synthèse protéique se fait après 20 minutes (Webster *et al.*, 2002).
- Action sur la membrane plasmique de certaines bactéries avec pour conséquence, l'empêchement de l'entrée de certains composés du milieu, comme l'uridine exogène à l'intérieur des cellules de *Salmonella typhimurium*, le glucose et d'autres sources carbonés dans les cellules d'*Escherichia coli* (Joshi *et al.*, 1982; Bergman, 1989).
- Inhibition la synthèse de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* en agissant sur la glucane et la mannane synthétases (Elorza *et al.*, 1976).
- Inhibition de la traduction, amplification des réponses aux stress et le blocage la dégradation des ARN messagers chez *Saccharomyces cerevisiae* (Jimenez *et al.*, 1973; Grigull *et al.*, 2004; Pelechano & Perez-Ortin, 2008).

## 5. Intérêt des dithiopyrrolones

### 5.1. En agronomie

L'activité antimicrobienne des DTPs contre les microorganismes phytopathogènes pourrait potentiellement être exploitée dans le domaine de la protection des cultures agricoles (Carolin, 2008). Les résultats de l'utilisation de la thiolutine dans la protection de quelques plantes contre certaines maladies sont présentés dans le tableau 3. Les travaux réalisés par Merrouche *et al.* (2017), ont montré que la thiolutine et d'autres des dérivés de DTPs (benzoyl-pyrrothine, formyl-pyrrothine, seneciroyl-pyrrothine, sorbyl-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine et valeryl-pyrrothine) additionnés à une concentration de 5 mM/100 g de sol, ont permis de réduire de 40 à 50% la fusariose vasculaire du lin due à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Meklat (2004) a rapporté que la thiolutine ajoutée à une concentration de 1,2 mg/plante à fait baisser de 40% la maladie "tache chocolat" de la fève, due à *Botrytis fabae*. La thiolutine est aussi signalée avoir une activité herbicide contre la mauvaise herbe *Lemna minor* et une

activité larvicide contre les larves des insectes nuisibles, comme *Lucilia sericata* (Cole et Rolinson, 1972; Schaffner, 1954).

**Tableau 3:** Exemples d'utilisation de la thiolutine dans le domaine agronomique.

La plante	Dose	Maladie	Le pathogène	Référence
Tomate	10 ppm	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	Fusariose vasculaire	(Gopalkrishnan & Jump, 1952)
Pommier		<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien	(Winter & Young, 1955)
Feuilles de tabac	0,8-7,2 ppm	<i>Peronospora tabacina</i>	Moisissure bleue	(Grosso, 1954)
Vigne	3-25 ppm	<i>Plasmopara viticola</i> <i>Pythium ultimum</i>	Mildiou Fonte des semis	(Dell I. <i>et al.</i> , 1992)
Vigne	1,2 mg / plante	<i>Botrytis fabae</i>	Tache chocolat	(Meklat, 2004)
Lin	5 mM/100 g.s.s.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> .	Fusariose vasculaire	Merrouche <i>et al.</i> (2017)

## 5.2. Dans d'autres domaines

Les dithiopyrrolones suscitent l'intérêt dans le domaine médical notamment pour leur activité anticancéreuse et leur capacité à stimuler la production des globules blancs. D'après le NCI (National Cancer Institute) des Etats Unis d'Amérique, la thiolutine a un rôle préventif contre les effets des substances carcinogènes des cellules épithéliales (Arnold *et al.*, 1995); le même effet est constaté pour les cellules des poumons, du colon, de la prostate, de la peau, des reins et du cerveau (Webster *et al.*, 2000). L'équipe japonaise de Masaaki Ishizuka, à l'Institut de Chimiothérapie de Shizuoka, a montré l'activité antiangiogénique de la thiolutine (Minamiguchi *et al.*, 2001). De plus, d'après le même institut, la thiolutine inhibe une protéine appelée l'intégrine  $\alpha\beta3$  alors que des études précédentes avaient prouvé que les inhibiteurs de l'intégrine  $\alpha\beta3$  empêchent la croissance des tumeurs (Brooks *et al.*, 1995). Minamiguchi *et al.* (2001) ont également montré que d'autres DTPs (auréothricine, holomycine, thioaurine, propiopyrrothine, etc.) possèdent les mêmes propriétés antitumorales. Des travaux plus récents, ont montré que la thiomarinole (dérivé de DTP) produite par *Pseudoalteromonas sp* SANK 73390 présente une activité antibiotique plus importante que l'antibiotique d'usage

clinique, la Mupirocine contre la souche *Staphylococcus aureus* Résistante à la Methicilline (Fukuda *et al.* 2011).

## 6. Synthèse chimique et biosynthèse et des dithiopyrrolones

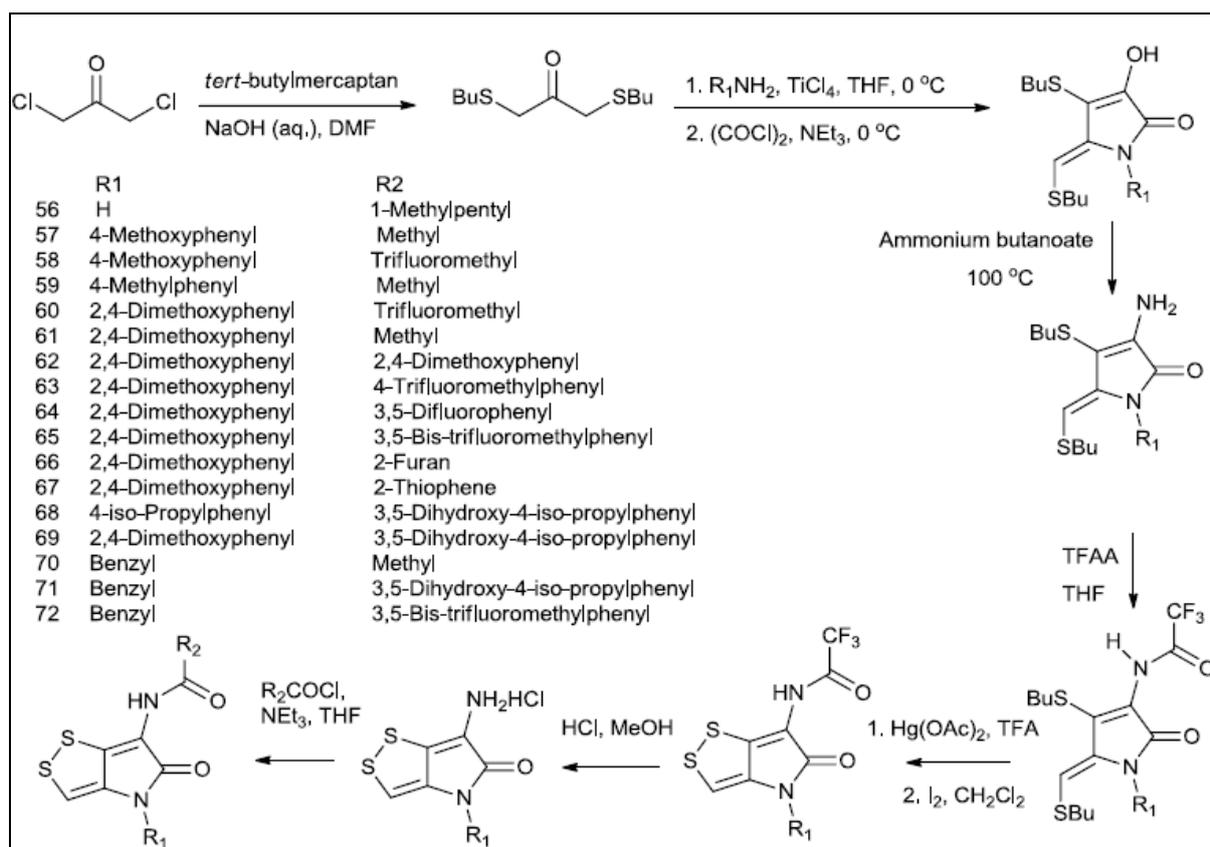
### 6.1. Synthèse chimique des dithiopyrrolones

Des études de synthèses chimiques de DTPs ont été tentées depuis le début des années 1960, et de nombreuses stratégies ont été développées. Les principales études sont les suivants :

- La première synthèse totale de la thiolutine a été réalisée en 1962, à partir de N-méthyl-1-éthoxycarbonyl-L-2-diéthoxyéthylamine et de chlorure de méthoxycarbonyl-acétyle (Schmidt *et al.*, 1962).
- La synthèse de l'holomycine a été réalisée en 10 étapes, à partir de p-méthoxyacétophénone et de thioglycolate de méthyle (Kishi *et al.* 1973).
- L'obtention de l'holomycine en une seule étape par clivage et décarboxylation de la 3-carboxyholomycine (Ellis *et al.* 1977).
- Le développement de la voie de biosynthèse de la xénorhabdine I et de quelques autres analogues (Hjelmgaard *et al.*, 2007).
- La synthèse totale de 17 dérivés dithiopyrrolones a été réalisée, à partir de matières premières disponibles dans le marché à l'échelle du kilogramme avec des substituants aromatiques sur l'atome d'azote du cycle pyrrole (Figure 3) (Chen *et al.*, 2008).
- Chorin *et al.* (2009) ont réalisé la synthèse chimique de 90 mg de la pyrrothine par adaptation du protocole décrit par Hjelmgaard *et al.* (2007).
- La première synthèse totale d'un dérivé du thiomarinole à trois composants, l'acide pseudomonique, l'acide 8-hydroxyoctonoïque et l'anhydroornithine. Le rendement total après 13 étapes de synthèse était de 22 % (Goss *et al.* 2012).

### 6.2. Biosynthèse et des dithiopyrrolones

Les premières études ont été réalisées par Furumai *et al.* (1982), qui ont proposé une voie de biosynthèse pour produire l'auréothricine par *S. kasugaensis*. La L-cystine a été identifiée comme un précurseur du noyau pyrrothine, et la formation d'une liaison amide entre la pyrrothine et un acide organique activé sous la forme d'un acyl-CoA est l'étape finale de la formation des DTPs. Plus tard, De la Fuente *et al.* (2002), ont mis en évidence une activité enzymatique catalysant l'acylation de l'holothine à partir d'acétyl-CoA dans des extraits cellulaires de mutants de *S. clavuligerus* producteurs d'holomycine.



**Figure 3:** La synthèse chimique des dérivés des dithiopyrrolones (Qin *et al.*, 2013).

Des résultats comparables ont été obtenus par Chorin *et al.* (2009), qui ont noté la formation de thiolutine (acétyl pyrrothine) et de benzoyl-pyrrothine à partir de l'acétyl-CoA et de la benzoyl-CoA respectivement dans un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*. Les travaux de Saker *et al.* (2014) ont confirmés la présence de ces deux enzymes.

Des études ultérieures réalisées par Li *et al.* (2010) et Huang *et al.* (2010) ont identifié le groupe de gènes qui dirige la biosynthèse de l'holomycine dans l'ADN génomique de *S. clavuligerus*.

Chez une bactérie marine, *Pseudoalteromonas sp.*, la voie de biosynthèse des dérivés de l'holothine (les xenorhabdins et les thiomarinoles) est dirigée par un cluster. Cependant la biosynthèse des thiomarinoles chez *S. clavuligerus* semble beaucoup plus complexe, en effet, elle contient deux clusters bien distincts, *tmp* pour la biosynthèse de l'acide marinolic et *hol* pour la biosynthèse de l'holothine (Fukuda *et al.*, 2011).

Très récemment, Qin *et al.* (2013) ont identifié le cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez une bactérie marine, Gram-négative, *Yersinia ruckeri*. Cette voie est très semblable à celle de la biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* proposée par Li et Walsh (2010) et Huang *et al.* (2010).

### III. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES DITHIOLOPYRROLONES

#### 1. Régulation par la nature de milieu de culture

Les différentes composantes du milieu de culture ont montré une grande influence sur la production de métabolites secondaires, entre autres chez les actinobactéries. Les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (Martin and Demain 1980). Bouras (2005) été le premier chercheur a étudié l'effet de la composition du milieu de culture sur la croissance de *Sa. algeriensis* et la production des DTPs. Ensuite, plusieurs travaux ont été réalisé sur la même actinobactérie pour améliorer la production des DTPs (Bouras *et al.*, 2006a; Bouras *et al.*, 2006b; Bouras *et al.*, 2008; Strub *et al.*, 2008; Chorin *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2011; Merrouche *et al.*, 2019 ; Merrouche *et al.*, 2020). Les principaux travaux sur l'effet des milieux de culture sur la production des DTPs sont les suivants :

- Bouras (2005), a mis au point un milieu semi-synthétique (SS) qui a permis une bonne croissance et une production significative des DTPs.
- Lamari (2006), a réalisé une étude similaire entre des milieux complexes (ISP2 et Bennett) et le milieu SS. Le résultat obtenu montre une bonne production des DTPs dans le milieu ISP2 + CaCO<sub>3</sub>. La concentration du carbonate de calcium ajouté est de 5 g/L, elle favorise à la fois la croissance de l'actinobactérie et la production des DTPs.
- Strub (2008), a utilisé le milieu SS additionné de MOPS à la place de CaCO<sub>3</sub> pour faciliter la détermination de la masse sèche et le travail en fermenteur. Cet auteur a essayé d'utiliser un milieu complètement synthétique pour la croissance de *Sa. algeriensis*, cependant, sa croissance était très faible sans extrait de levure.

#### 2. Régulation par les précurseurs

Les antibiotiques sont bio-synthétisés à partir de précurseurs (acides aminés, acides organiques, bases puriques et pyrimidique, etc.) par des voies métaboliques spécifiques. Cette biosynthèse est soumise à un ensemble de mécanismes de régulation intervenant aux niveaux anabolique, catabolique et énergétique de la cellule. La régulation peut s'exercer directement sur les gènes ou les enzymes de synthèse des métabolites secondaires et/ou indirectement sur les voies de biosynthèse des métabolites primaires précurseurs. Les différents mécanismes de régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires, en particulier des antibiotiques, ont

été abondamment répertoriés (Piret et Demain, 1988; Demain, 1998; Bouras, 2005; Strub, 2008).

### 2.1. Influence des acides aminés

Les acides aminés soufrés constituent des précurseurs directs pour la formation du noyau pyrrothine (Furumai *et al.*, 1982). En se basant sur cette idée, Bouras (2005) a étudié l'effet de l'ajout de 20 acides aminés sur la production des DTPs chez *Sa. algeriensis*. Cet auteur a noté que, selon la nature de l'acide aminé soufré utilisé, la production des DTPs est plus ou moins importante. L'addition de la cystéine (à 5 mM) et de la cystine (à 10 mM) a augmenté d'une façon remarquable la production spécifique de la senécioyl-pyrrothine, de la tigloyl-pyrrothine, et de la butanoyl-pyrrothine. En revanche, la production spécifique maximale de la thiolutine est enregistrée en présence de la cystine (5 mM) et sans addition de la cystéine. Cependant, avec des concentrations à partir de 10 mM, ces acides aminés ont un effet inhibiteur sur la production de ces DTPs.

Les travaux de Li et Walsh (2010), sur la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*, ont montré que la cystéine représente le précurseur direct du noyau pyrrothine.

### 2.2. Influence des acides organiques

L'influence des acides organiques dans le milieu SS sur la production des DTPs par *Sa. algeriensis* a été bien étudiée (Bouras 2005, Merrouche, 2012). Ces essais se sont basés sur l'idée que ces acides organiques activés sous formes d'acyls-CoA aboutiraient à la formation de différents dérivés de dithiopyrrolones, selon le type de radical greffé sur l'azote n° 4 du noyau pyrrole (Furumai *et al.*, 2002; Bouras, 2005). Les acides organiques peuvent être donc de potentiels précurseurs des dithiopyrrolones. Les résultats obtenus par Bouras (2005) sur l'effet de 90 acides organiques sur la production des DTPs chez *Sa. algeriensis*, ont montré que l'ajout des acides organiques à une concentration optimale de 5 mM dans le milieu SS influence non seulement la quantité des dithiopyrrolones déjà produites dans le témoin sans précurseurs, mais aussi la production de nouvelles dithiopyrrolones, qui ne sont pas connues pour être produites par *Sa. algeriensis*.

Les travaux réalisés par d'autres chercheurs sur la même actinobactérie ont permis de caractériser la structure chimique de 10 nouveaux dérivés de dithiopyrrolones induites par l'ajout d'acides organiques (acide valérique, sorbique et cinnamique) dans le milieu SS, dont 9 dérivés sont produits par la souche de *Sa. algeriensis* uniquement (Merrouche *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2011; Merrouche *et al.*, 2019).

### 3. Régulation par voie enzymatique

Chorin (2009), a mis en évidence une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase impliquée dans la biosynthèse des DTPs dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu semi-synthétique SS, additionné ou non en acide organique. Le transfert du groupement acétyl- sur la pyrrothine catalysé par une activité enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase conduit à la formation de la thiolutine (acétyl-pyrrothine). Le transfert du groupement benzoyl- sur la pyrrothine catalysé par une activité enzymatique pyrrothine N-benzoyltransférase exerce la synthèse de la benzoyl-pyrrothine. Par la suite, les travaux de Saker *et al.* (2014) ont caractérisé biochimiquement les activités acétyl-transférase et benzoyl-transférase présentes dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*.

## IV. LA SOUCHE *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* NRRL-B24137

### 1. Origine de *Sa. algeriensis*

Cette souche d'actinobactérie a été isolée en 1992 à partir du sol d'une palmeraie du sud du Sahara algérien (à Adrar), elle a été classée dans un premier temps dans le genre *Nocardioopsis* (Boudjella, 1994). Par la suite, en se basant sur une taxonomie numérique, incluant 77 tests physiologiques, suivie d'une étude moléculaire (séquençage de l'ADNr 16S, hybridation ADN-ADN), elle a été reclassée dans le genre *Saccharothrix*, et nommée *Saccharothrix algeriensis* (Zitouni *et al.* 2004).

### 2. Caractéristiques et taxonomie de *Sa. algeriensis*

Morphologiquement, *Sa. algeriensis* présente un mycélium aérien abondant, de couleur jaune-orange et un mycélium du substrat jaune vif. Des pigments diffusibles de même couleur sont abondamment sécrétés. Sous microscope électronique, la souche apparaît fragmentée en longues chaînes de spores à surface lisse (Zitouni *et al.* 2004) (Figure 4).

Physiologiquement, l'analyse des constituants cellulaires a montré que cette souche contient des sucres taxonomiquement importants (le couple rhamnose-galactose, le glucose et le ribose), des phospholipides caractéristiques (la phosphatidyl-éthanolamine et de l'hydroxy-phosphatidyl-éthanolamine) et des acides gras et ne possède pas d'acides mycoliques pariétaux (Zitouni *et al.*, 2004c).

Le tableau 4 représente la classification de *Sa. algeriensis*.



**Figure 4 :** Vue au microscope électronique à balayage des chaînes de spores de *Sa.algeriensis* croissance sur milieu ISP2, à 30°C pendant 10 jours (Zitouni *et al.*, 2004).

**Tableau 4:** Classification de *Sa. algeriensis*

<b>Taxon</b>	<b>Position</b>
Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Classe	<i>Actinobacteria</i>
Sous-classe	<i>Actinobacteridae</i>
Ordre	<i>Actinomycetales</i>
Sous-ordre	<i>Pseudonocardineae</i>
Famille	<i>Actinosynnemataceae</i>
Genre	<i>Saccharothrix</i>
Espèce	<i>Sa. algeriensis</i>

### 3. Spectre d'action de *Sa. algeriensis*

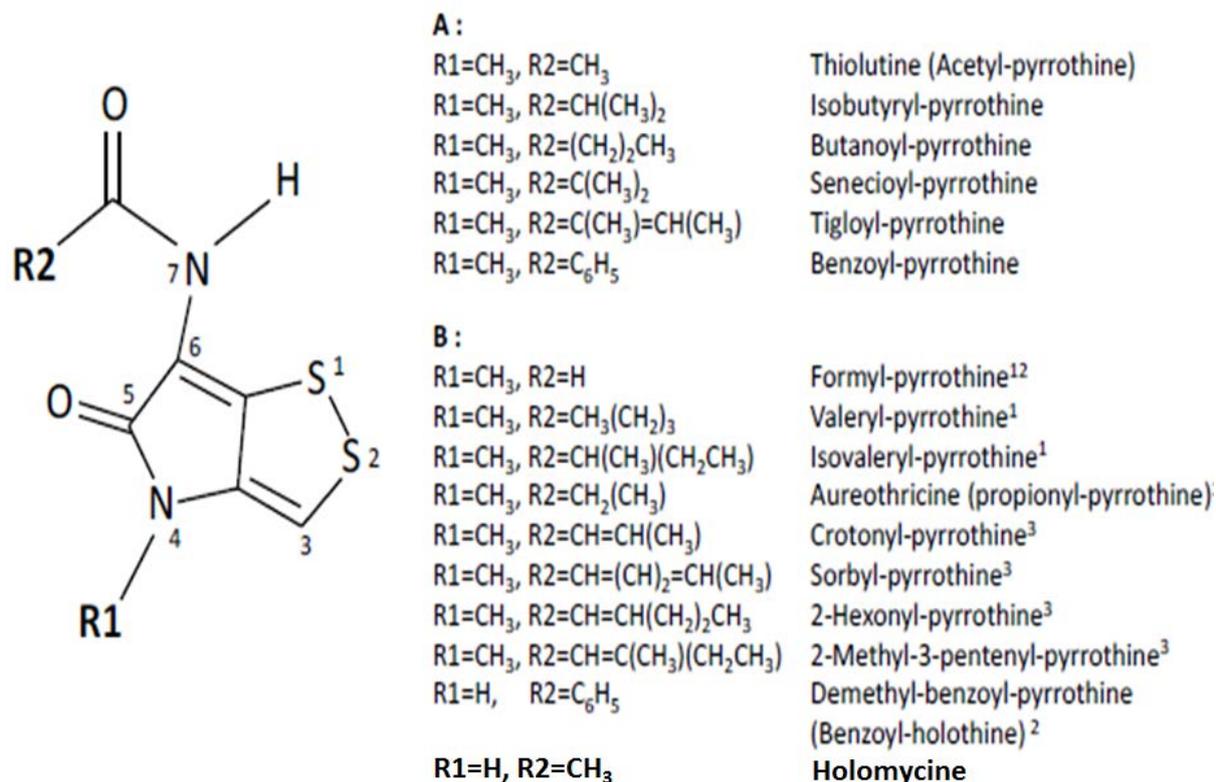
*Sa. algeriensis* présente un spectre d'action assez large, qui touche es bactéries à Gram positif (ex. *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia Marcescens*), champignons filamenteux (*Rhizoctoria solani*, *Botrytis cinerera* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) et les levures

(*Candida albicans* et *Debaryomyces subglossus*). Cette activité est généralement forte contre les bactéries à Gram positif et les champignons, moyenne contre les levures et moyenne, faible à nulle contre les bactéries à Gram négatif (Zitouni, 1995; Lamari, 2006).

L'évaluation de l'activité *in vitro* de cette souche d'actinobactérie, a montré une activité appréciable contre les champignons phytopathogènes, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, *F. o. ciceris*, *F. o. lentis* et *F. o. lycopersici* avec des zones d'inhibition de 12, 10, 09 and 06 mm respectivement (Merrouche *et al.* 2017).

#### 4. Les dithiopyrrolones sécrétés par *Sa. algeriensis*

Des études réalisées par Lamari *et al.* (2002a) ont montré que *Sa. algeriensis* produit dans le milieu de base (sans ajout de précurseurs) cinq dérivés de la DTPs caractérisés par leurs différents groupes N-acyle (R) : acétyl-pyrrothine (thiolutine), iso-butyryl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, sénéciol-pyrrothine et tigloyl-pyrrothine. De nouvelles DTPs ont été isolées et identifiées dans le surnageant de culture de *Sa. algeriensis* (Bouras *et al.*, 2008; Merrouche *et al.*, 2010, Merrouche *et al.*, 2011; Merrouche *et al.*, 2019 ; Merrouche *et al.*, 2020). Ces nouvelles molécules ont été obtenues par l'ajout au milieu de culture semi-synthétique, des acides organiques : acide valérique, acide sorbique, acide cinnamique et l'acide aminée cystine (Figure 5).



**Figure 5 :** Structure des DTPs produites par *Sa. algeriensis*. **A** produits dans le milieu de base sans précurseurs (Lamari et al., 2002b), **B** produits après ajout de précurseurs (Merrouche et al., 2010; Merrouche et al., 2011; Merrouche et al., 2019; Merrouche et al., 2020).

# **Chapitre 2**

## **Matériel et Méthodes**

## I. MATERIEL

### 1. La souche de *Sa. algeriensis*

La souche d'actinobactérie *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, a été isolée par la méthode de suspensions-dilutions (Rapilly, 1968), sur milieu « chitine-vitamines B agar » (CH. V) (Hayakawa et Nonomura, 1987), à partir d'un échantillon du sol saharien de la palmeraie d'Adrar (Boudjella, 1994).

### 2. Les microorganismes-cibles

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de la souche d'actinobactérie *Sa. algeriensis*, des bactéries à Gram négatif et Gram positif et des champignons sont utilisés comme microorganismes cibles (Tableau 5). Ces microorganismes proviennent du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de Kouba-Alger.

**Tableau 5 :** Liste des microorganismes cibles.

Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif	Champignons
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceris</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Graminearum</i>

### 3. Conservation des souches

L'actinobactérie et les microorganismes cibles sont conservés à 4°C par repiquages successifs sur milieu solide ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) (Shirling et Gottlieb, 1966) et milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Rapilly, 1969) respectivement.

### 4. Milieux de cultures

#### 4.1 Milieux de conservation des microorganismes

La composition des deux milieux ISP2 et PDA est la suivante :

##### \* Milieu ISP2

- Extrait de levure : 4 g
- Extrait de malt : 10 g
- Glucose : 4 g
- Agar : 20 g

- Eau distillée : 1000 ml
- pH : 7,2

**\* Milieu PDA**

- Filtrat de pomme de terre : 500 ml
- Glucose : 20 g
- Agar : 20 g
- Eau distillée : 500 ml
- pH : 6,5

#### **4.2 Milieux du test d'antagonisme**

Pour le test d'antagonisme de l'actinobactérie, le milieu PDA a été utilisé pour évaluer l'activité antifongique et le milieu Muller Hinton ([Marchal et al.,1987](#)), pour évaluer l'activité antibactérienne.

La composition du milieu MH est la suivante :

**\* Milieu MH**

- Extrait de viande : 3 g
- Hydrolysate de caseine : 17.5 g
- L'amidon : 1.5 g
- L'agar : 12 g/l
- L'eau distillée : 1000 ml
- pH : 7.2

#### **4.3. Milieux de production d'antibiotiques**

Pour la production des dithiolopyrrolones par *Sa. algeriensis*, le milieu semi-synthétique préconisé par [Bouras \(2005\)](#). La composition du milieu SS est la suivante :

**\* Milieu SS**

- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>: 2 g
- NaCl: 2 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.5 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g
- MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O: 0.2 g
- CaCOH<sub>3</sub>: 5 g
- Agar: 20 g
- Eau distillé: 1000 ml
- pH: 7,2

Des acides aminés et des acides organiques sont ajoutés au milieu SS à une concentration de 5 mM comme sources de carbones et d'azotes, afin d'étudier leur effet sur la production de dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Les acides aminés et organiques sont les suivants :

- Acide Malonique :  $C_3H_4O_4$
- Acide Sulfanilique :  $C_6H_7NO_3S$
- Leucine :  $C_6H_{13}NO_2$
- Tyrosine :  $C_9H_{11}NO_3$

En plus des quatre milieux de cultures utilisés, la production des DTPs est effectuée dans un milieu témoin qui ne contient aucun précurseur.

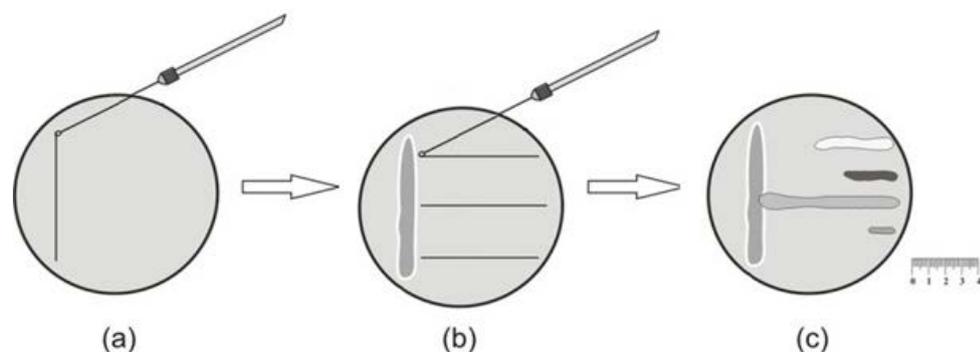
## II. METHODES

### 1. Evolution de l'activité antagoniste de *Sa. algeriensis* sur milieux solides

L'activité antimicrobienne de *Sa. algeriensis* sur milieu solide est évaluée par deux méthodes, à savoir, la méthode des stries croisées et celle des disque d agar

#### 1.1. Méthode des stries croisées

C'est une technique simple qui permet de tester l'activité d'une souche d'actinobactérie sur plusieurs microorganismes et sur la même boîte de pétrie (Figure 6). La souche est ensemencée en un seul trait à la surface du milieu ISP2, et en bordure de la boîte de Pétri (diamètre = 20 mm). Après incubation pendant 10 jours à 30°C, les microorganismes-cibles sont inoculés par stries perpendiculaires à l'actinobactérie. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre la bordure de la souche-cible et celle de l'actinobactérie, et ce après 24 h d'incubation à 30°C pour les bactéries et 48 h pour les champignons.



**Figure 6 :** Schéma représentatif de la méthode des stries croisées.

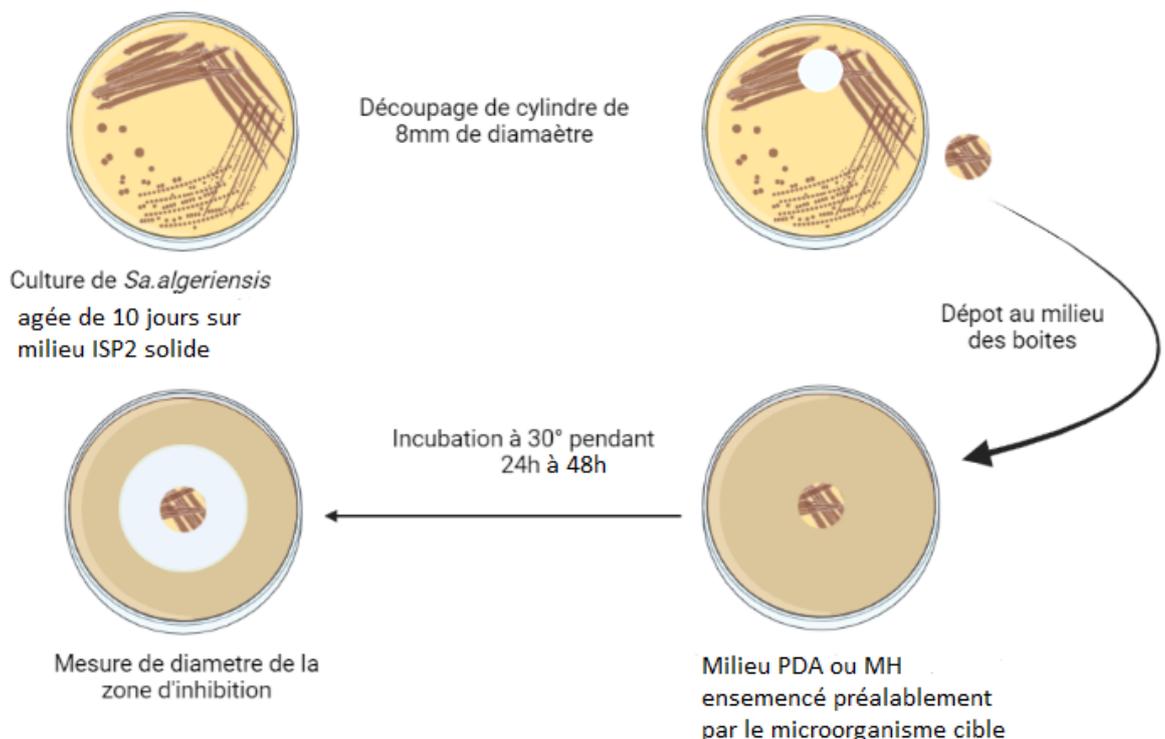
**a :** Ensemencement de l'actinobactérie en un seul trait en bordure de boîte de Pétri.

**b :** Ensemencement des souches-cibles perpendiculairement à l'actinobactérie.

**c :** Mesure de la distance d'inhibition après la période d'incubation.

## 1.2. Méthode des disques d'agar

L'activité antimicrobienne de *Sa. algeriensis* a été évaluée également par la méthode des cylindres d'agar (Patel et Brown, 1969). Cette méthode consiste à ensemencer la souche d'actinobactérie à tester en stries serrées sur milieu ISP2 solide, puis incubé pendant 10 jours à 30°C. Après incubation, des cylindres d'agar de huit millimètres de diamètre sont découpés stérilement à partir de la culture mûre à l'aide d'un emporte-pièce, puis déposés à la surface des boîtes contenant le milieu PDA semi solide (12 g/l agar) pour les champignons cibles et le milieu MH semi solide pour les bactéries cibles. Les milieux semi solides sont préalablement ensemencés par les champignons cibles ou les bactéries cibles prélevés des suspensions préparées selon la méthode de Bouznada (2018). Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 2 h, avant d'être incubées, afin de permettre une bonne diffusion des substances actives, tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 24 h d'incubation à 30°C pour les bactéries et 48 h pour les champignons. La figure 7, illustre les étapes de cette méthode.

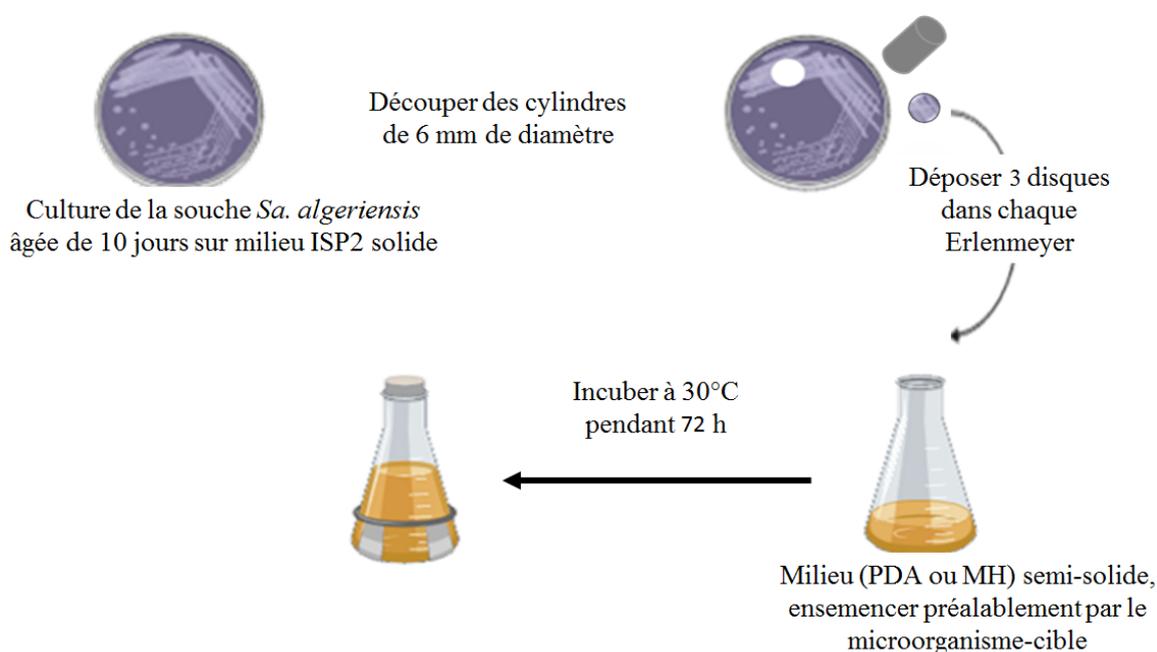


**Figure 7:** Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche d'actinobactérie par la méthode des cylindres d'agar.

## 2. Production des dithiopyrrolones en milieux liquides

### 2.1. Préparation des pré-cultures

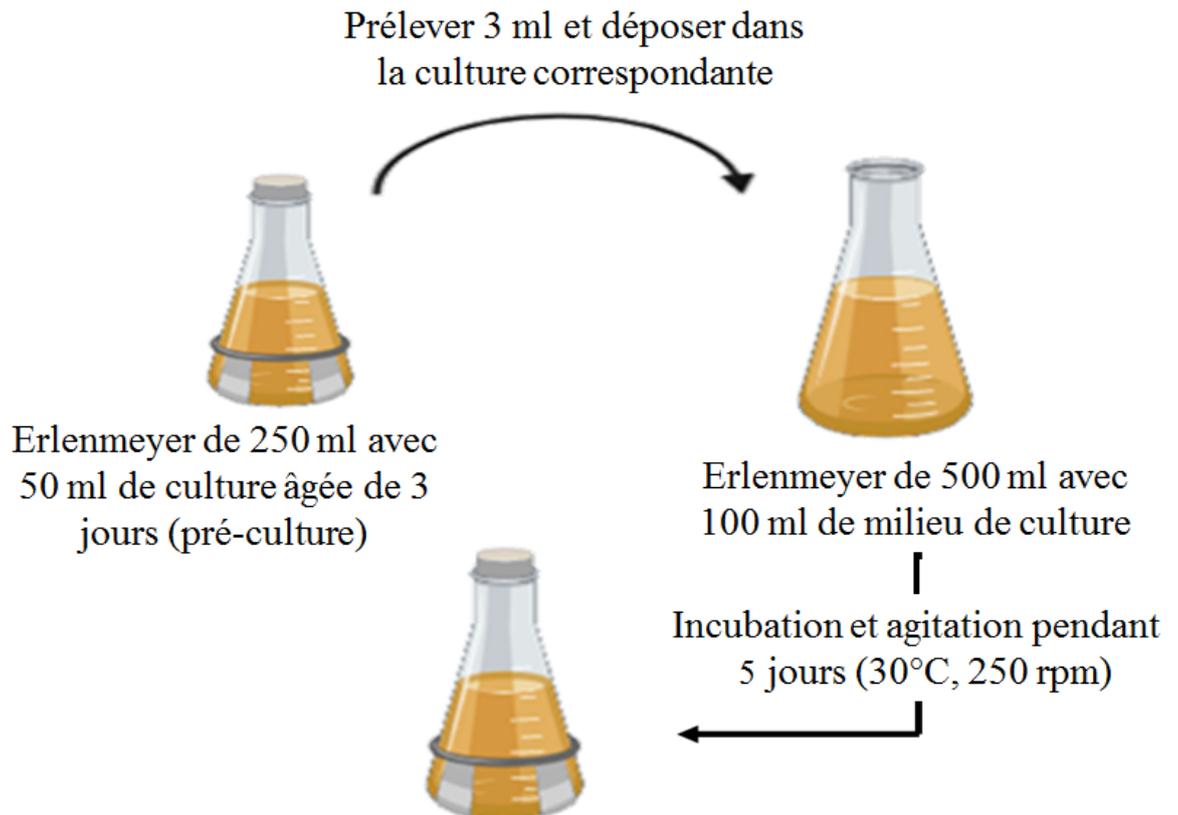
Des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, contenant chacune 50 ml de milieu de culture liquide, sont ensemencées par 3 disques de 6 mm à partir des cultures mûres correspondantes de la souche *Sa. algeriensis*. Les fioles sont incubées à 30°C dans un shaker, dans des conditions d'agitation permanente à 250 rpm, pendant 3 jours (Figure 8). Les pré-cultures sont préparées pour chaque milieu : MSS témoin (MSS-Te), MSS+acide malonique (MSS-M), MSS+acide sulfanilique (MSS-S), MSS+leucine (MSS-L) et MSS+tyrosine (MSS-Ty).



**Figure 8:** Préparation des pré-cultures de la souche *Sa. algeriensis* dans les milieux liquides MSS-Te, MSS-M, MSS-S, MSS-L et MSS-Ty.

### 2.2. Préparation des cultures

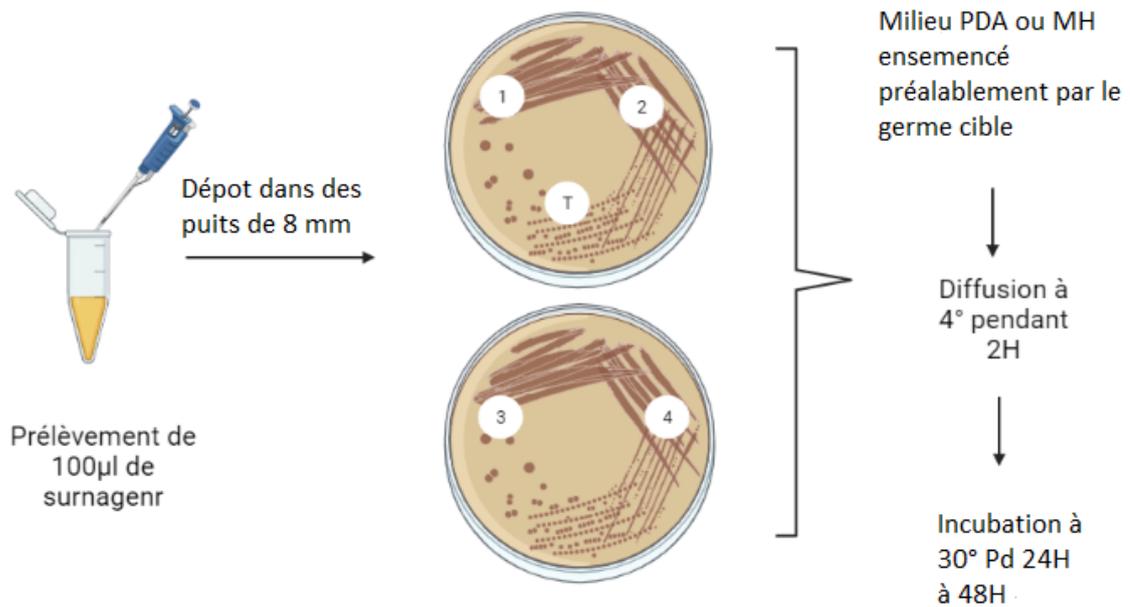
Des Erlenmeyers de 500 ml, contenant chacun 100 ml de milieu liquide (MSS-T, MSS-M, MSS-T, MSS-L et MSS-Ty) sont ensemencés par 3 ml (soit  $1 \pm 0,2$  mg : [Aouiche, 2011](#)) de la pré-culture correspondante (âgée de 3 jours) fortement vortexée. Les conditions d'incubation sont : une température de 30°C et une agitation rotative permanente de 250 rpm dans un shaker pendant 5 jours (Figure 9).



**Figure 9 :** Préparation des cultures de la souche *Sa. algeriensis* dans les milieux liquides MSS-Te, MSS-M, MSS-S, MSS-L et MSS-Ty.

### 3. Mise en évidence de l'activité des dithiopyrrolones par la méthode des puits

L'activité antimicrobienne est déterminée par la méthode de diffusion des puits (Aszalos, 1986). Cette méthode consiste à ensemencer 50  $\mu$ l de la suspension de chaque germe cible (*Listeria monocytogenes* : Lm ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* : Foc) dans un flacon contenant 50 ml du milieu PDA (pour le champignon) ou milieu MH (pour la bactérie) semi solide, maintenu en surfusion à 45 °C. Chaque flacon est coulé dans deux boîtes de pétri de 90 mm puis laissées solidifier. Après solidification du milieu, deux à trois puits de 8 mm de diamètre sont effectués dans chaque boîte de Pétri. Chaque puits des deux cultures de germes cibles (Lm et Foc) reçoit 100  $\mu$ l de surnageant de chaque culture (MSS-Te, MSS-M, MSS-S, MSS-L et MSS-Ty) obtenue le cinquième jour d'incubation. Les boîtes sont mises pendant 2 h à 4°C, afin de permettre une bonne diffusion des antibiotiques, tout en inhibant momentanément la croissance des germes cibles et sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 h pour les bactéries et 48 h pour les champignons. Les diamètres d'inhibition autour des puits sont alors mesurés (Figure 10).



**Figure 10:** Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche *Sa. algeriensis* sur milieu PDA et MH par la méthode de diffusion des puits.

#### 4. Extraction des dithiopyrrolones

L'extraction des DTPs à partir des cinq milieux de cultures est réalisée le cinquième jour d'incubation, ce jour est noté comme jour optimale de la production de ces antibiotiques (Merrouche, 2012).

Les filtrats de culture obtenue des cinq milieux de culture (MSS-Te, MSS-M, MSS-S, MSS-L et MSS-Ty) sont centrifugés pendant 15 min, puis mélangés dans des ampoules à décanter avec un volume égal de dichlorométhane. Ce dernier est considéré comme meilleur solvant d'extraction des dithiopyrrolones (Lamari, 2006).

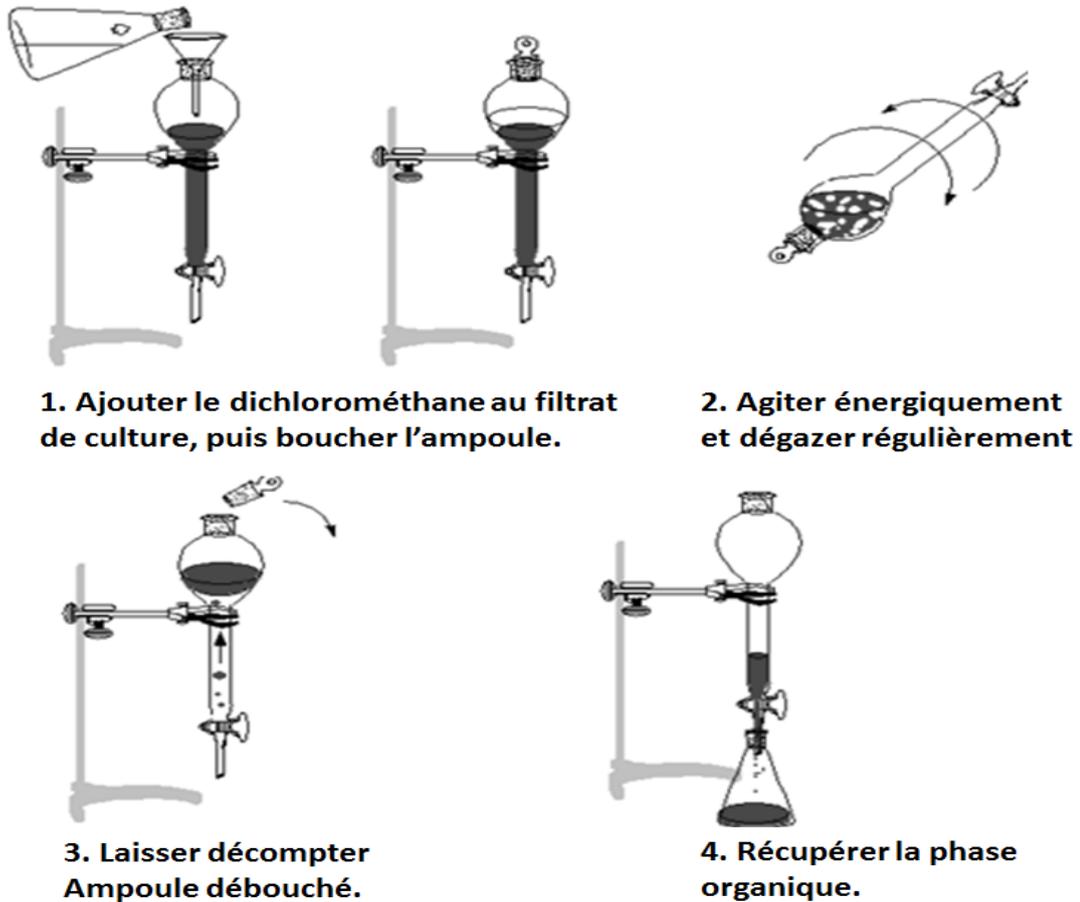
Suite à une décantation, 2 phases ont été obtenue dans chaque ampoule : une phase organique et une phase aqueuse. Les phases organiques sont récupérées, puis déshydratées par passage à travers un papier filtre (Whatman n°1), contenant 2 g du sulfate de sodium anhydre, afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les différentes phases organiques, ont été concentrés sous vide à 40°C et 50°C respectivement, en utilisant un

évaporateur rotatif, les résidus secs obtenus ont été récupérés dans 1 ml de méthanol et testés pour leur activité antimicrobienne par antibiographie.

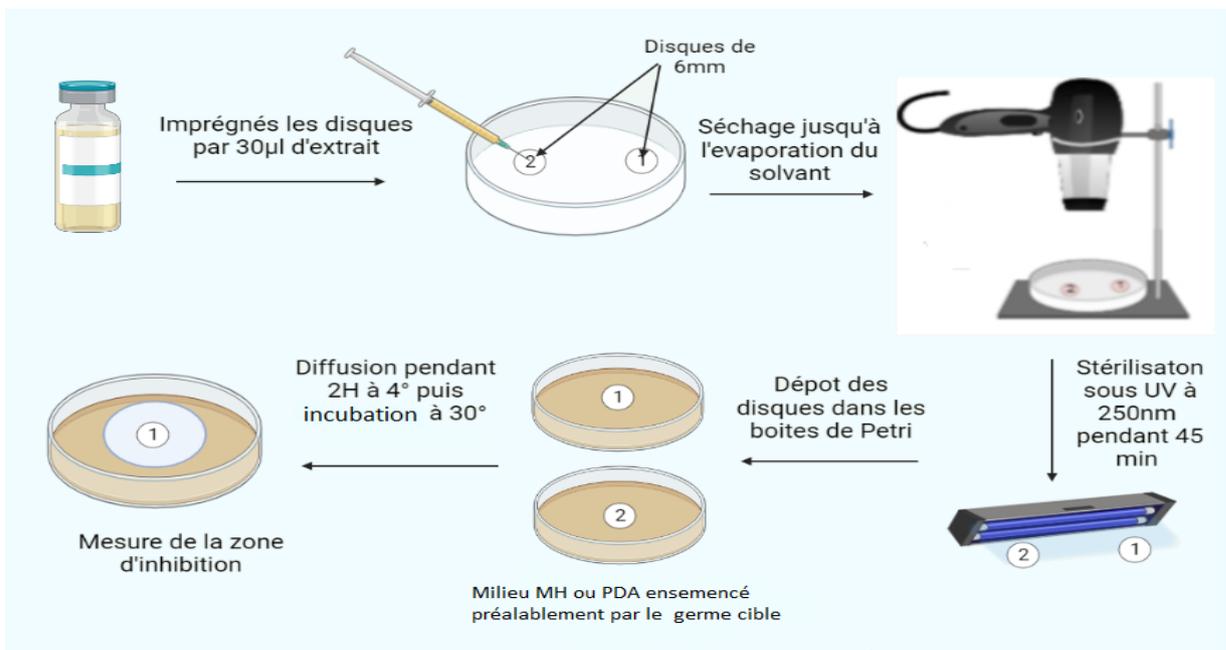
Le protocole de l'extraction liquide-liquide est montré au niveau de la figure 11.

## **5. Antibiogramme**

Afin de tester l'activité contre Lm et Foc, des disques de papier de six millimètres de diamètre, sont imprégnés par 30 µl de chaque extrait obtenu à l'aide d'une micro-seringue, ces disques sont par la suite séchés, dans le but d'évaporer le solvant, puis stérilisés sous UV à 254 nm, pendant 45 min. Les disques imprégnés sont ensuite déposés dans des boîtes de pétrie contenant un milieu PDA et MH semi-solide préalablement ensemencé par le champignon et la bactérie cible respectivement. Ces dernières sont mises à 4°C pendant 2 h afin de permettre une diffusion des substances actives tout en arrêtant la croissance des germes cibles, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait après 24 h pour la bactérie et 48 h pour le champignon, par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques. Un schéma représentatif de la méthode des disques de papier est illustré par la figure 12.



**Figure 11 :** Protocole d'extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter.



**Figure 12:** Test d'activité par antibiographie de la souche *Sa. algeriensis* contre Foc et Lm.

# **Chapitre 3**

## **Résultats et Discussion**

## I. RESULTATS

### 1. Activité *in vitro* de *Saccharothrix algeriensis* sur milieu solide

L'activité antimicrobienne de *Saccharothrix algeriensis* a été évaluée par méthode des stries croisées et la méthode des cylindres d'agar, contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif pathogènes pour l'homme : *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Entérocooccus faecalis* (Ef) et *Listeria monocytogènes* (Lm), et conte des champignons phytopathogènes: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc), *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop), *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) et *Fusarium graminearum* (Fg).

#### 1.1. La méthode des stries croisées

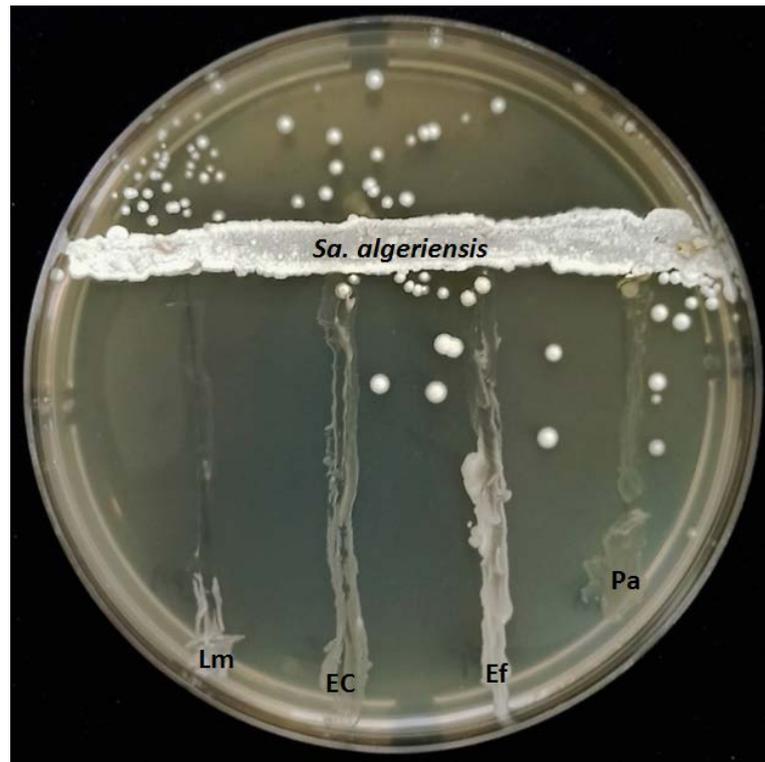
Les résultats obtenus du test d'antagonisme par la méthode des stries croisées ont montré que la souche *Sa. algeriensis*, présente une activité antibactérienne importante contre Lm, moyenne contre Ef et nulle contre Pa et Ec. Quant à l'activité antifongique, elle était forte à moyenne contre Foc, Foa et Fg et faible contre Fop.

Les résultats des tests d'antagonisme *in vitro* par la méthode des stries croisées sont présentés dans le tableau 6 et les figures 13 et 14.

**Tableau 5:** Activité antagoniste de *Sa. algeriensis* par la méthode des stries croisées.

Microorganisme cible	Zone d'inhibition en mm
<i>Listeria monocytogenes</i>	35
<i>Enterococcus faecalis</i>	9
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceris</i>	33
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	21
<i>Fusarium graminearum</i>	18
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Pisi</i>	05

**Note :** Les valeurs représentent les zones d'inhibition entre le bord de l'actinomycète et ceux des microorganismes-cibles.



**Figure 13:** Activité antagoniste de *Sa. algeriensis* contre les bactéries Ec ,Pa , Ef et Lm par la méthode des stries croisées.



**Figure 14:** Activité antagoniste de *Sa. algeriensis* contre les champignons Foc, Foa, Fg et Fop par la méthode des stries croisées.

## 1.2. La méthode des disques d'agar

A titre comparatif, l'activité antimicrobienne a été mise en évidence également par la méthode des cylindres d'agar. Des résultats très proches ont été obtenus par cette méthode, avec des zones d'inhibitions un peu plus élevées. La bactérie Lm et le champignon Foc sont notés comme les microorganismes les plus sensibles, avec des zones d'inhibition de 37 et 35 mm respectivement.

**Tableau 6:** Activité antagoniste de *Sa. algeriensis* par la méthode de cylindres d'agar.

Microorganisme cible	Zone d'inhibition en mm
<i>Listeria monocytogenes</i>	37
<i>Enterococcus faecalis</i>	11
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceris</i>	35
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	22
<i>Fusarium graminearum</i>	20
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Pisi</i>	07



**Figure 15:** Activité antifongique de *Sa. algeriensis* contre le champignon Foc par la méthode des cylindres d'agar.



**Figure 16 :** Activité antibactérienne de *Sa. algeriensis* contre la bactérie Lm par la méthode de cylindre d'agar.

## **2. Production des dithiopyrrolones sur milieux liquides**

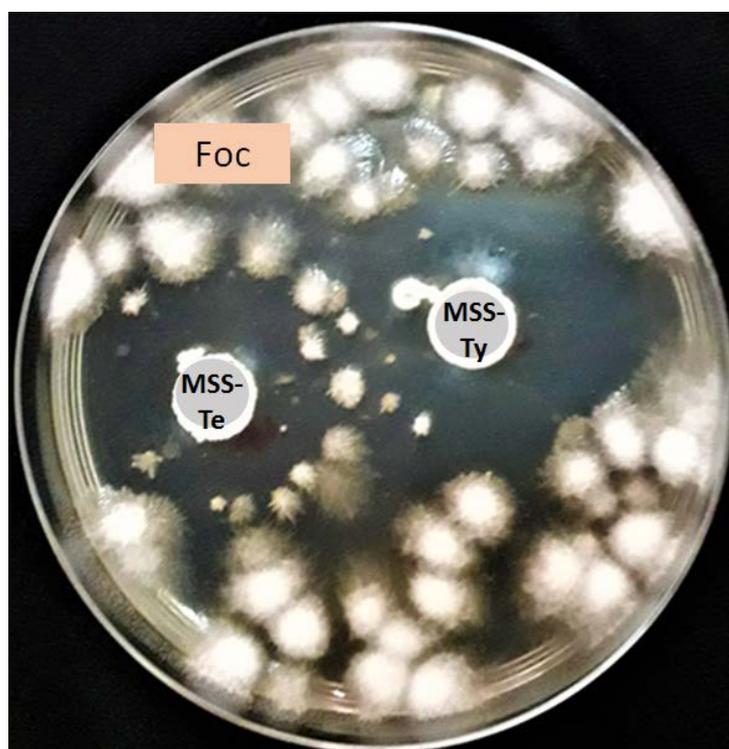
Une production des dithiopyrrolones est effectuée dans un milieu semi-synthétique (SS) de base (témoin) et milieu SS additionnée de quatre précurseurs (acide malonique, acide sulfanilique, leucine et tyrosine). Cette production est réalisée dans un shaker pendant 5 jours à une température de 30°C et une agitation rotative permanente de 250 rpm.

### **2.1. Mise en évidence des dithiopyrrolones par la méthode des puits**

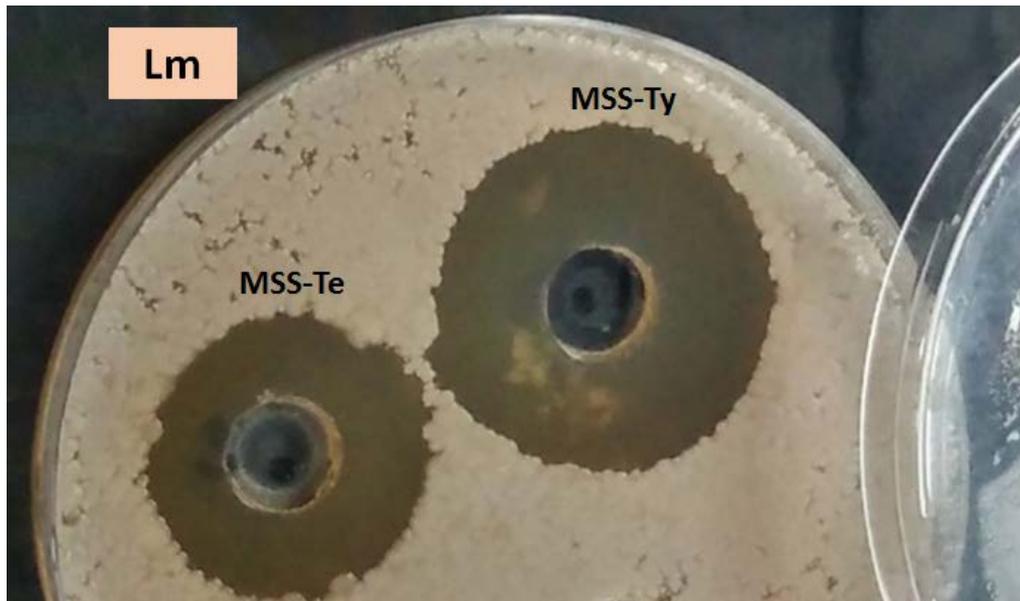
L'activité antimicrobienne est déterminée le 5<sup>ème</sup> jour par la méthode de diffusion des puits à partir des filtrats de culture des cinq milieux (MSS-Te, MSS-S, MSS-M, MSS-Ty et MSS-L) contre les deux microorganismes cibles Lm et Foc. Les résultats obtenus (Tableau 8), ont montré que cette activité est variable selon la nature du précurseur additionnée. La meilleure activité est notée en présence de la tyrosine comme source d'azote et l'acide sulfanilique comme source de carbone.

**Tableau 7:** Activité antimicrobienne des filtrats de culture de *Sa. algeriensis*, contre Lm et Foc au 5ème jour de la production par la méthode des puits.

Milieux	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	
	Lm	Foc
MSS-Te	33	28
MSS-Ty	40	35
MSS-L	38	32
MSS-S	35	28
MSS-M	33	27



**Figure 17 :** Activité antifongique de *Sa. algeriensis* sur milieu MSS-Ty et MSS-Te liquides contre Foc au 5ème jour de la production des dithiopyrrolones.



**Figure 18 :** Activité antibactérienne de *Sa. algeriensis* sur milieu MSS-Ty et MSS-Te liquides contre Lm au 5ème jour de la production des dithiopyrrolones..

### 3. Extraction des dithiopyrrolones

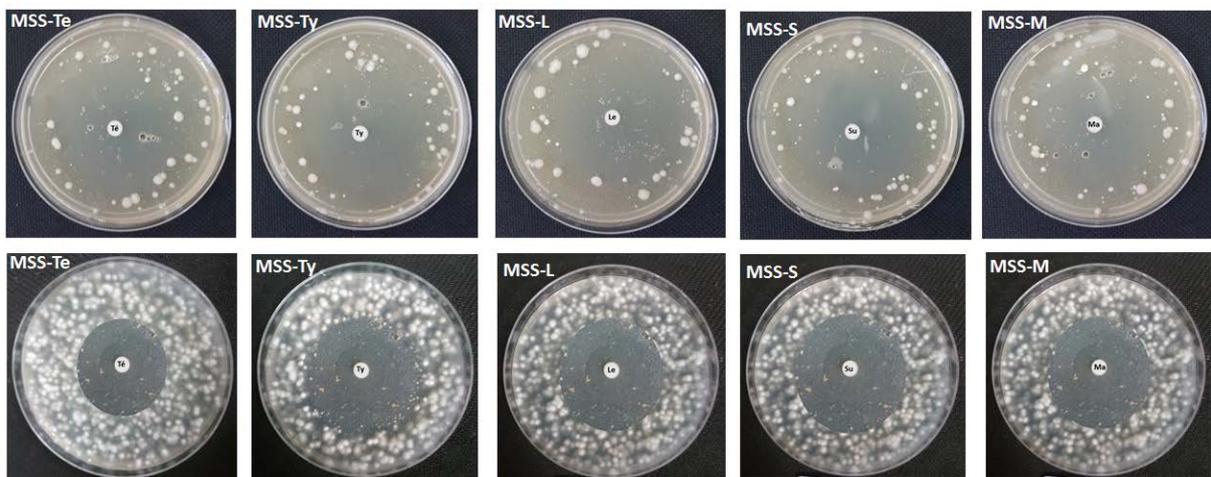
L'extraction des dithiopyrrolones est effectuée à partir des filtrats de culture des cinq milieux de culture par le dichlorométhane. Après extraction, les phases organiques obtenues sont évaporées à sec par un rotavapeur. Les extraits bruts obtenus ont un aspect poudreux de couleur jaune vif à jaune orangé.

#### 3.1. Antibiogramme

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits organiques contre Foc et Lm, sont illustrés par le tableau 9 et la figure 19. Une bonne activité antimicrobienne a été notée dans tous les extraits testés. Les zones d'inhibitions notées dans les milieux additionnés des acides aminés et organiques, sont généralement différentes de celle obtenue dans le milieu témoin. L'activité antibactérienne était plus importante que l'activité antifongique avec une meilleure zone d'inhibition notée dans l'extrait obtenu à partir du milieu MSS-Ty (55 mm), suivi par MSS-L (50 mm).

**Tableau 9** : Activité antimicrobienne des extraits organiques des filtrats de culture de la souche *Sa. algeriensis* vis-à-vis Foc et Lm.

Extraits (à partir des milieux)	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	
	Lm	Foc
MSS-Te	45	30
MSS-Ty	55	35
MSS-L	50	37
MSS-S	47	37
MSS-M	45	35



**Figure 19** : Révélation par antibiographie des activités antimicrobiennes des extraits organiques obtenus des filtrats de culture des 5 milieux (MSS-Te, MSS-Ty, MSS-L, MSS-S et MSS-M), de *Sa. algeriensis* contre: Lm (en haut) et Foc (en bas).

## II. DISCUSSION

Les résultats des tests d'antagonisme *in vitro* de *Sa. algeriensis* par la méthode des stries croisées et des disques d'agar, ont montré que l'activité antimicrobienne est forte à moyenne contre les bactéries à Gram positif et les champignons et nulle, contre les bactéries à Gram négatif testées. Les zones d'inhibitions notées par la méthode des disques d'agar, ont été légèrement plus élevées. Cette dernière méthode permet une meilleure diffusion des microorganismes dans un milieu plus adapté à leur croissance, ou la densité de l'inoculum est préalablement connue, ce qui rend les résultats plus fiables.

Des résultats similaires ont été obtenus sur l'activité de *Sa. algeriensis* par d'autres chercheurs, qui ont également noté la résistance des bactéries à Gram négatif (Lamari, 2006; Merrouche, 2012). En effet, plusieurs travaux de recherche antérieurs ont montré des propriétés antagonistes intéressantes des espèces appartenant à ce genre, vu qu'il sont productrices de plusieurs antibiotiques d'une grande diversité structurale et à spectre d'action assez intéressant dirigé contre les bactéries à Gram positif, parfois contre les champignons et rarement contre les bactéries à Gram négatif (Lamari *et al.*, 2002a ; Aouiche *et al.*, 2012; Boubetra *et al.*, 2013c, 2015; Merrouche *et al.*, 2020). La plus grande résistance des bactéries à Gram négatif par rapport aux Gram positif est un phénomène connu (Prescott *et al.*, 2002). Elles possèdent une double membrane (enveloppe cellulaire), ce qui leur confère de nombreux mécanismes de résistance contre plusieurs antibiotiques (Gupta *et al.*, 2011). Des résultats obtenus par d'autres chercheurs, ont montré l'effet antagoniste des souches de *Saccharothrix* contre plusieurs champignons phytopathogènes, tel que *Sa. algeriensis* qui a présenté des activités antifongiques appréciables contre des champignons appartenant au genre *Fusarium*, y compris, ceux qui sont responsables du flétrissement vasculaire du pois chiche (Foc) (Merrouche *et al.*, 2017).

La production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* est effectuée sur milieu semi synthétique. Il est important de signaler le rôle influent des milieux de culture dans la production des antibiotiques. Le choix du milieu de culture SS est basé sur les travaux réalisés par des chercheurs, qui ont obtenu des résultats intéressants avec ce milieu qui fournit des facteurs de croissance et de production des dithiopyrrolones (Bouras, 2005; Strub, 2008; Merrouche, 2012). Des acides organiques et aminés sont ajoutés au milieu SS comme sources de carbone et d'azote respectivement, à une concentration de 5 mM. Selon Bouras (2005), l'effet des acides aminés et des acides organiques sur la production des dithiopyrrolones dépendait de la concentration utilisée. D'une manière générale, cette production est diminuée

lorsque la concentration de n'importe quel substrat (acide aminé ou acide organique) est augmentée. Plusieurs auteurs ont constaté l'effet négatif des fortes concentrations de sources d'azote (acides aminés ou sels d'ammonium) sur la production des antibiotiques, comme la céphamycine C chez *Streptomyces clavuligerus* (Lebrihi, 1988), la thiénamycine chez *S. cattleya* (Lilley *et al.*, 1981), le chloramphénicol chez *S. venezuelae* (Shapiro, 1989) et la tylosine chez *S. fradiae* (Tanaka *et al.*, 1985).

Une bonne activité antimicrobienne est détectée dans les filtrats de culture des cinq milieux utilisés (MSS-Te, MSS-L, MSS-Ty, MSS-S et MSS-M), et ce, le cinquième jour d'incubation. Ce jour a été noté comme meilleur jour de production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* (Lamrai, 2006; Merrouche, 2012). Selon Merrouche (2012), cette production est notée pendant la phase de déclin. 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 également avoir lieu même en phase exponentielle (Zitouni, 2005; Badji, 2006). Plusieurs chercheurs ont montré que différents facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques influencent la production des métabolites secondaires tels que les facteurs physicochimiques (pH, température, agitation et aération) et les facteurs nutritionnels. En effet, ces facteurs nutritionnels peuvent réguler la production des métabolites secondaires, tout en activant ou en inhibant les enzymes impliqués dans leur biosynthèse (Bouras, 2005; Strub, 2008, Chorin, 2009; Saker, 2013).

L'extraction des dithiopyrrolones a été effectuée à partir des filtrats des 5 cultures en utilisant le dichlorométhane, tel que décrit par Lamari (2006). Les phases organiques obtenues sont évaporées à sec. Les extraits bruts obtenus ont un aspect poudreux de couleur jaune vif à jaune orangé. Les tests d'antibiographie des 5 extraits obtenus ont montré que l'activité antimicrobienne était variable selon la nature du précurseur additionnée. Les résultats obtenus par Bouras *et al.* (2006) et Bouras *et al.* (2008), ont montré que la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* est donc influencée quantitativement et qualitativement selon la nature et la concentration des acides aminés ou des acides organiques utilisés. Les acides organiques interviennent dans la formation de la chaîne latérale des dithiopyrrolones et les acides aminés peuvent être des précurseurs directs ou indirects dans la formation du noyau de base.

Enfin, il serait indispensable d'analyser les différents extraits obtenus à partir de la culture témoin et des cultures additionnées des 4 précurseurs par HPLC analytique pour détecter les différents pics produits. Le profil d'élution obtenu dans chaque milieu doit être

comparé avec le profil obtenu dans le milieu témoin, pour noter la possibilité de l'apparition de nouveaux pics après addition des précurseurs. *Sa. algeriensis* a déjà montré sa capacité de produire un grand nombre de dérivés de dithiopyrrolones selon la nature des acides aminés et organiques additionnées au milieu de culture SS (Merrouche *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2011; Merrouche *et al.*, 2018; Merrouche *et al.*, 2020).

# **Conclusion générale**

## CONCLUSION GENERALE

Parmi les nombreuses substances bioactives produites par les actinobactéries, les antibiotiques occupent la première place. Ceux-ci ont été largement étudiés notamment chez le genre *Streptomyces* qui domine dans de nombreux écosystèmes. Cependant, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les recherches sont orientées vers des genres peu fréquents et rares provenant d'environnements peu communs voir extrêmes (Demain et Lancini, 2006), dont le genre *Saccharothrix* originaires des milieux extrêmes, notamment des sols du Sahara algérien (Bouznada, 2018).

Ce travail, qui rentre dans le cadre d'un axe de recherche du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, vise à étudier la production des antibiotiques par des actinobactéries rares isolés à partir des milieux extrêmes.

*Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 est une actinobactérie qui produit des antibiotiques appartenant au groupe des dithiopyrrolones. Cette souche possède une grande capacité de produire un grand nombre de dérivés de dithiopyrrolones selon la nature de précurseur ajoutés au milieu de culture. De ce fait, nous avons étudié l'influence de l'ajout de 2 acides aminés (leucine et tyrosine) et 2 acides organiques (acide malonique et acide sulfanilique) sur la production des dithiopyrrolones par cette souche d'actinobactérie.

Notre travail a permis de noter le potentiel antagoniste de la souche *Sa. algeriensis* contre des bactéries à Gram positif et les champignons phytopathogènes, cependant, les bactéries à Gram négatif se sont révélés résistants.

La production des dithiopyrrolones est obtenus au 5<sup>eme</sup> jour d'incubation, ce jour est noté comme le jour optimale de la production, des résidus secs sont obtenus après extraction par le dichlorométhane.

Les extraits obtenus à partir de milieu SS (Témoin) et après l'addition des précurseurs (leucine, tyrosine, acide malonique et acide sulfanilique) sont testés par antibiographie. Les résultats ont montré des zones d'inhibition avec un diamètre d'inhibition qui varie entre 45 à 55 mm contre *Listeria monocytogenes* et 30 mm à 37 mm contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, ce qui suggère la différence dans la nature ou la quantité des dithiopyrrolones produites dans chaque milieu.

A l'issu de ce travail, il est recommandé d'analyser les extraits obtenus, par HPLC analytique et les comparer avec le spectre obtenu dans le milieu témoin, afin de voir la possibilité de produire ne nouveaux pics de dithiopyrrolones.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

-A-

**Abdel-Razek A.S., El-Naggar M. E., Allam A., Morsy O. M., and Othman S. I. (2020).** Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, **8**(4): 470-478. <https://doi.org/10.3390/pr8040470>

**Aouiche A. (2011).** Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme : isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. [Mémoire de Magister en microbiologie, Université Djillali Liabès de Sidi-Bel-abbès].

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

**Arnold J.T., Wikinson B.P., Sharma S. and Steele V.E. (1995).** Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. *Cancer Research*, **55**: 537-543.

**Aszalos A. A. (Ed.). (1986).** Modern analysis of antibiotics. Drugs and the pharmaceutical sciences. New York: Dekker.

**Ayad A., Drissi M., de Curraize C., Dupont C., Hartmann A., Solanas S., Siebor E., Amoureux L., and Neuwirth C. (2016).** Occurrence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Escherichia coli* in Algerian hospitals. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 1–6.

**Azman A.S., Mawang C.I., Khairat J.E. and AbuBakar S. (2019).** "Actinobacteria—a promising natural source of anti-biofilm agents." *International Microbiology*: **5**: 1-7.

**-B-**

**Badji, B. (2006).** Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. [Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou].

**Baker W., van den Broek A., Camon E., Hingamp P., Sterk P., Stoesser G., Tuli M. A. (2000).** The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Research*, **28**: 19–2

**Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, **58**: 1-26.

**Berdy J., Aaszalos A., and Nitt K. L. (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds.

**Bo Li, Walter J. Wever, Christopher T. Walsh, and Albert A. Bowers (2014).** Dithiolopyrrolones: Biosynthesis, Synthesis, and Activity of a Unique Class of Disulfide-Containing Antibiotics. *Natural product reports*, **31**(7): 905–923.

**Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A. and Mathieu F. (2013c).** "Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil." *Microbiological research*, **168**: 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.11.005>.

**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 prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. [Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177 p]

**Bouras N. (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. [Thèse de Doctorat, école nationale supérieure agronomique, Toulouse. 238 p].

**Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006a).** "Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137." *Journal of applied microbiology*, **100**: 390-397.

**Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006b).** "Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolones antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**: 1423-1429.

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

**Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S., Abrini J., and Dakka N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries.

**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, École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 252 p].

**Brahmi S., Touati A., Dunyach-Remy C., Sotto A., Pantel A., and Lavigne J.P. (2018).** High prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in wild fish from the Mediterranean Sea in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, **24**: 290–298.

**Brooks P.C., Strömblad S., Klemke R.L., Visscher D., Sarkar F.H. and Cheresch D.A. (1995).** Antiintegrin  $\alpha_3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *Journal of Clinical Investigation*, **96**: 1815-1822.

-C-

**Cavallo J. D., Fabre R., Jehl, F., Rapp C. et Garrabé E. (2004).** "Bétalactamines." *EMC-Maladies infectieuses*, **1**: 129-202.

**Chen G., Guo Y., Li. B.** Dithiolopyrrolones compounds and their therapeutic applications. Patent WO2008038175 A3, 12 June 2008.

**Choi U. and Lee C.R. (2019).** Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 953.

**Chorin A. C., Bijeire L., Monje M. C., Baziard G., Lebrihi A. and Mathieu F. (2009).** Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiolopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *Journal of applied microbiology*, **107**: 1751-1762.

**Cole M. and Rolinson G.N. (1972).** Microbial metabolites with insecticidal properties. *Applied Microbiology*, **24**: 660-662.

**-D-**

**De la Fuente A., Lorenzana L. M., Martin J. F. and Liras P. (2002).** Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: Possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *Journal of Bacteriology*, **184**: 6559-6565.

**Demain, A. L. (1998).** Induction of microbial secondary metabolism. *International journal of microbiology*, **1**: 259-264.

**Demain A. L., Lancini G., (2006).** Bacterial pharmaceutical products in prokaryotes. **1**: 812-833

**Dilip C.V., Mulaje S. S., and Mohalkar R.Y. (2013).** A review on Actinomycetes and their biotechnological application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **4**(5): 1730-1742.

**Djaballah C. E., Kitouni M., Raoult D. and Khelaifia S. (2018).** *Streptomyces massialgeriensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from an extremely saline soil

collected from the dry lake of Ank el Djamel in Algeria. *New Microbes and New Infections (NMNI)*, **21**: 18-19.

**Djinni I., Defant A., Kecha M. and Mancini I. (2019).** Actinobacteria Derived from Algerian Ecosystems as a Prominent Source of Antimicrobial Molecules. *Antibiotics*, **8**: 172.

**Driche E. H., Belghit S., Bijani C., Zitouni A., Sabaou N., Mathieu F. and Badji B. (2015).** A new *Streptomyces* strain isolated from Saharan soil produces di-(2-ethylhexyl) phthalate, a metabolite active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*, **65**: 1341-1350.

**-E-**

**Ellis J.E., Fried J.H., Harrison I.T., Rapp E., and Ross C.H.** Synthesis of holomycin and derivatives (1977). *The Journal of Organic Chemistry*, **42**: 2891–2893.

**Elorza M.V., Lostau C.M., Villanueva J.R. and Sentandreu R. (1976).** - Cell wall synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of RNA and protein inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta*, **454**: 263-272.

**-F-**

**Fauchere J. L. (2002).** Bactériologie générale et médicale, Ellipses.

**Fukuda D., Haines A. S., Song Z., and other authors (2011).** A Natural Plasmid Uniquely Encodes Two Biosynthetic Pathways Creating a Potent Anti-MRSA Antibiotic. *Plos One* **6**, e18031.

**Furumai T., Takeda K. and Okanishi M. (1982).** Function of plasmids in the production of aureothricin .1. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. *Journal of antibiotics research*, **35**: 1367-1373.

**-G-**

**Genilloud O. (2017).** Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, **34**: 1203-1232.

**Genilloud O. (2019).** Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: 81–87.

**George M., Anjumol A., George G., and Hatha A. A. M. (2012).** "Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats." *African Journal of Microbiology Research*, **6**: 120-129.

**Ghannoum M. A. and Rice L. B. (1999).** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**:501-517.

**Goss R.J.M., Shankar S., and Fayad A.A. (2012).** The generation of “unNatural” products: Synthetic biology meets synthetic chemistry. *Natural product reports*, **29**: 870–889.

**Gupta, R. S. (2011).** Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **100**: 171–182.

#### -H-

**Hashizume H., Adachi H., Igarashi M., Nishimura Y. and Akamatsu Y. (2010).** - Biological activities of pargamicin A, a novel cyclic peptide antibiotic from *Amycolatopsis* sp. *Journal of antibiotics research*, **63**: 279-283.

**Hayakawa M., and Nonomura H. (1987).** Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, **65**: 501–509.

**Hjelmgaard T., Givskov M., and Nielsen J. (2007).** *Organic and Biomolecular Chemistr*, **5** : 344.

**Hjelmgaard T., Givskov M., and Nielsen J. (2007).** Expedient total synthesis of pyrrothine natural products and analogs. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **5**: 344-348.

**Huang S., Zhao Y., Qin Z., Wang X., Onega M., Chen L., He J., Yu Y. and Deng H. (2010).** Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, **46**: 811-816.

**Hug J. J., Chantal D. B., Maja R., Katarina C., and Rolf M. (2018).** "Concepts and Methods to Access Novel Antibiotics from Actinomycetes." *Antibiotics*, **7** (44).

**-J-**

**Jimenez A., Tipper D.J., and Davies J. (1973).** Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **3**: 729-738.

**Joffin J. N., and Leyral.G. (2006).** Microbiologie technique -Tome 1 : Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine. P 368.

**Joffin J.N., and Leyral.G. (2006).** Microbiologie technique -Tome 1 : Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine, pp. 368.

**Joshi A., Verma M., and Chakravorty M. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1982;** 22 :541–547.

**Junker B., Walker A., Hesse M., Lester M.,Christensen J., and Connors N. (2009).** Actinomycetes scale up for the production of antibacterial nocathiacin. *Biotechnology progress*, **25**: 176-188.

**-K-**

**Kat L., and Baltz R. (2016).** Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of industrial microbiology & biotechnology.*, **43**(2-3): 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.

**Khachatourians G.G., and Tipper D.J., (1974).** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, *Journal of Bacteriology*, **6**:304–310.

**Khebizi N. (2018).** Étude taxonomique de trois souches de *Streptomyces* isolées des sols Sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques produits par *Streptomyces* sp. HG29. [Thèse de doctorat, École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 164 p].

**Kishi Y., Fukuyama T., and Nakatsuka S. (1973).** A new method for the synthesis of epidithiodiketopiperazines. *The Journal of the American Chemical Society*, **95**: 6490–6492.

-L-

**Lahoum A., Sabaou N., Bijani C., Bouras N., Pont F., Snini S. P. and Mathieu F. (2019).** Antimicrobial activities of novel bipyridine compounds produced by a new strain of *Saccharothrix* isolated from Saharan soil. *The Saudi Pharmaceutical Journal*, **27**: 56-65.

**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 Algérie), 177 p].

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

**Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E., and Tillequin F. (2002b).** New Dithiolopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical Properties and Structure Elucidation. *Journal of antibiotics research*, **55**: 702-707.

**Lebrihi A., Lefebvre G., and Germain P. (1988).** "Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **28**: 44-51.

**Lewis K. (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**: 107-131.

**Li B., and Walsh C.T. (2010).** Identification of the gene cluster for the dithiopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **107**: 19731-19735.

**Lilley G., Clark A.E., and Lawrence G.C. (1981).** - Control of the production of cephamycin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. *Jornal of Chemistry*, **31**: 127-134.

**Lo Grasso L., Chillura-Martino D., and Alduina R. (2016).** Production of antibacterial compounds from Actinomycetes, *Actinobacteria - basics and biotechnological applications*, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, *Intech Open*. Chapter 7. <https://doi.org/10.5772/61525>.

**-M-**

**Mallié M., and Bastide J. M. (2001).** Les nouveaux antifongiques et leurs stratégies de recherche. *Revue Francophone des Laboratoires*, **332**: 63-70

**Maltezou H.C. (2008).**  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of panresistance. *International journal of antimicrobial agents*, **33**(5) : 405-407.

**Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., and Kim S. (2013).** "Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives." *Microbiological Research*, **168**: 311–332.

**Meklat A. (2004).** Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'anthracnose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin. [Thèse de Magister, E.N.S de Kouba].

**Merrouche R., Yekkour A., Coppel Y., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Sabaou N., (2020).** *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, the first non-*Streptomyces* actinobacterium, produces holomycin after cystine feeding. *Archives of Microbiology*, **202**: 2509–2516

**Merrouche, R. (2012).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones 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., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M. C., Sabaou N., and Lebrihi A. (2010).** Dithiopyrrolone Antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *Journal of natural products*, **73**: 1164-1166.

**Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., and Lebrihi A. (2011).** "New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137." *FEMS microbiology letters*, **318**: 41- 46.

**Merrouche R., Yekkour A., Coppel Y., Bouras N., Zitouni A., Lebrihi A., Mathieu F., and Sabaou, N. (2019).** A new dithiopyrrolone antibiotic triggered by a long fermentation of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 in sorbic acid-amended medium. *Letters in Applied Microbiology*. **7**: 51-58

**Merrouche R., Yekkour A., Lamari L., Zitouni A., Mathieu F., and Sabaou N. (2017).** Efficiency of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 and Its Produced Antifungal Dithiopyrrolones Compounds to Suppress *Fusarium oxysporum*-Induced Wilt Disease Occurring in Some Cultivated Crops. *Arabian Journal for Science and Engineering*, **42**(6): 2321-2327.

**Merrouche, R., Yekkour, A., Coppel, Y., Bouras, N., Lamari, L., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2018).** "Effective biosynthesis of benzoyl-pyrrothine dithiopyrrolone antibiotic by cinnamic acid-precursor addition in culture of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137." *Letters Applied Microbiology* **68**: 165-1.

**Messai Y., Labadence H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Guatier V., Arlet G., and Bakour R. (2008).** Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathology and Biology*, **8**: 319-325.

**Minamiguchi K., Kumagai H., Masuda T., Kawada M., Ishizuka M., and Takeuchi T. (2001).** *The International Journal of Cancer*, **93**:307–316.

**Mori S., Shrestha S. K., Fernández J., Álvarez San Millán M., Garzan A., Al-Mestarihi A. H., Lombó F., and Garneau-Tsodikova S. (2017).** "Activation and Loading of the Starter Unit during." *Thiocoraline Biosynthesis. Biochemistry*, **56**: 4457-4467.

**Murphy A. C., Fukuda D., Song Z., Hothersall J., Cox R. J., Willis C. L., and Simpson T. J. (2011).** Engineered thiomarinol antibiotics active against MRSA are generated by mutagenesis and mutasynthesis of pseudoalteromonas SANK73390. *Angewandte Chemie - International Edition*, **50**(14): 3271–3274.

**-N-**

**Niemi J. (1995).** Hybrid anthracycline antibiotics: Analysis and application of rhodomycine biosynthetic genes from *Streptomyces purpuracens*. PH.D. Thesis University of Turku (Finland).

**-O-**

**O'Neil J. (2016).** Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on antimicrobial resistance*.

**O'Neill A., Oliva B., Storey C., Hoyle A., Fishwick C., and Chopra I. (2000).** RNA polymerase inhibitors with activity against Rifampin- Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 3163-3166.

**Olano C., Lombó F., Méndez C., and Salas J. A. (2008).** "Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering." *Metabolic Engineering*, **10**: 281-292.

**Oskay M., Tamer A.U., and Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, **3**(9): 2–. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2087>

**-P-**

**Parungao M.M., Maceda E.B.G., and Villano M.A.F. (2007).** Screening of antibiotic producing actinomycetes from marine, brackish and terrestrial sediment of Samal Island, Philippines. *Journal of Computing Science and Engineering*, **4**: 29-38.

**Patel J. J., Brown M. E. (1969).** Interactions of *Azotobacter* with rhizosphere and rootsurface microflora. *Plant Soil*, **31**, 273–281. <https://doi.org/10.1007/BF01373570>.

**Pelechano V., and Pérez-Ortín J.E. (2008).** *Yeast*, **25**:85–92.

**Piret J. M., and Demain A. L. (1988).** Actinomycetes in biotechnology: an overview in: Goodfellow M., Mordarski M and Williams S.T. (Edn.). London, Actinomycetes in biotechnology. *Academic Press*.

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

**-Q-**

**Qin Z., Baker A. T., Raab A., Huang S., Wang T., Yu Y., Jaspars M., Secombes C. J., and Deng H. (2013).** The Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Produces Holomycin and Uses an RNA Methyltransferase for Self-resistance. *Journal of Biological Chemistry*, **288**: 14688-14697.

**Qin Z., Huang S., Yu Y., and Deng H. (2013).** Dithiolyrrolone natural products: Isolation, synthesis and biosynthesis. *Marine Drugs*, **11**(10): 3970–3997.

**-R-**

**Rapilly F. (1968).** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Institut National de la Recherche Agronomique.

**Rizzato C., Torres J., Kasamatsu E., Camorlinga-Ponce M., Bravo M. M., Canzian F., and Kato I. (2019).** "Potential role of biofilm formation in the development of digestive tract cancer with special Reference to *Helicobacter pylori* Infection." *Frontiers in Microbiology*, **10**: 846.

**Robertsen H.L., and Musiol-Kroll E.M. (2019).** Actinomycete-derived polyketides as a source of antibiotics and lead structures for the development of new antimicrobial drugs. *Antibiotics (Basel)*, **8**(4):157. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040157>

**Roh H., Uguru G.C., Ko H.J., Kim S., Kim B.Y., and Goodfellow M. (2011).** Genome sequence of the abyssomicin and proximicin-producing marine actinomycete *Verrucosispora maris* AB-18-032, *Journal of Bacteriology Research*, **193**: 3391-3392.

**-S-**

**Saker S. (2013).** Etude de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 : approche génétique et enzymologique. [Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse, France].

**Saker S., Lebrihi A., and Mathieu F. (2014).** Identification of two putative acyltransferase genes potentially implicated in dithiopyrrolone biosyntheses in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B- 24137. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**(3): 787–802.

**Schaffner C.P. (1954).** - Studies on orchid media inhibitory to fungi. *American Orchid Society Bulletin*, 798-802.

**Schmidt U., and Geiger F. (1962).** Total Synthesis of the Antibiotics Thiolutin, Aureothricin, and Holomycin. *Angewandte Chemie International Edition*, **8**: 261- 265.

**Shapiro S. (1989).** Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. *In: regulation of secondary metabolism in Actinomycetes*, pp. 135-211. Edited by S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.

**Shirling E. B., and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **16**: 313–340.

**Sivasubramanian N., and Jayaraman R. (1976).** *Molecular Genetics and Genomics*, **145**: 9–96.

**Solecka J., Zajko J., Postek M., and Rajnisz, A. (2012).** "Biologically active secondary metabolites from actinomycetes." *Center European Journal Biology*, **7**: 373-390.

**Stachel H.D., Eckl E., Immerz-Winkler E., Kreiner C., Weigand W., Robl C., Wünsch R., Dick S., and Drescher N. (2002).** *Helvetica Chimica Acta*, **85**:4453–4467.

**Stahl P., Seidel H., Von der Eltz H., Wilhelms O.H., and Roesch A. (1988).** Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof. Patent US4760077.

**Strub C., Brandam C., Meyer X., and Lebrihi A. (2008).** Investigations of *Saccharothrix algeriensis* Growth on Synthetic Media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **106**, 148-153.

**Šturdíková M., Proska B., Uhrín D., and Fuska J. (1990).** *Folia Microbiologica*, **35**: 278–283.

**-T-**

**Tanaka Y., Taki A., Masuma R., and Omura S. (1985).** – Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Journal of antibiotics research*, **39**: 813- 821.

**Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L., and Champs C. D. (2006).** "First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria." *International journal of antimicrobial agents*, **27**: 397-402.

**-V-**

**Van Bambeke F., and Tulkens P. (2008).** Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire. Université catholique de Louvain, UCL 73.70 avenue E. Mounier 73. 1200 Bruxelles.

**Veyssiere A. (2020).** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019.

-W-

**Webster J.M., Chen G., Hu K., and Li J. (2002).** - Bacterial metabolites, *In: Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler (ed.). CAB International. p 99-114.

**Webster, J.M., Li, J. and Chen, G. (2000).** Anticancer property of dithiolopyrrolones, U.S. Patent  
6,020,360.

**Wietz M., Mansson M., Gotfredsen C. H., Larsen T. O., and Gram L. (2010).** Antibacterial compounds from marine Vibrionaceae isolated on a global expedition. *Marine Drugs*, **8**(12): 2946–2960.

-Y-

**Yagoubat M., Ould El-Hadj-Khelil A., Malki A., Bakour S., Touati A., and Rolain J.M. (2017).** Genetic characterisation of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria isolated from the University Hospital Mohamed Boudiaf in Ouargla, southern Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **8**: 55–59.

-Z-

**Zhai Y., Bai S., Liu J., Yang L., Han L., Huang X., and He J. (2016).** Identification of an unusual type II thioesterase in the dithiolopyrrolone antibiotics biosynthetic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **473**(1): 329–335.

**Zhang Y., Wang H. F., Liu Q., Hozzein W. N., Wadaan M. a., Cheng J., Chen Y. J., Zhang Y. M., and Li W. J. (2013).** "*Streptomyces fukangensis* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from a saline- alkaline soil." *Antonie Van Leeuwenhoek*, **104**: 1227-1233.

**Zitouni A. (1995).** Les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (Actinomycetales) dans les sols sahariens : taxonomie numérique ; extraction ; purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. [Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 177 p].

**Zitouni A., Mathieu F., Coppel Y., Pont F., Sabaou,N., and Lebrihi A. (2004).**  
"Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103: II. Physico  
chemical properties and structure elucidation." *The journal of antibiotics* **57**: 373-378.

## ANNEX

### Milieu SS

-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>: 2 g

-Nacl: 2 g

-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.5 g

-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g

-MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O: 0.2 g

-CaCOH<sub>3</sub>: 5 g

-Agar: 20 g

-Eau distillé: 1000 ml

-pH: 7,2