

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri- Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie-Microbiologie

N° d'ordre : 113/TS/2012

N° de série : 03/BE/2012

Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Option : Biotechnologies Microbiennes

Par :

Boughachiche Faiza

Intitulée :

Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebka.

Devant le jury :

Président:	BENGUEDOUAR A.	Professeur à l'Université Mentouri de Constantine
Directeur de thèse:	BOULAHROUF A.	Professeur à l'Université Mentouri de Constantine
Examineurs:	KARAM N.	Professeur à l'Université Es-sénia d'Oran
	GUECHI A.	Professeur à l'Université Ferhat Abbas de Sétif
	SAKA S.	Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba

Année universitaire 2011-2012

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier « Allah » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Abderrahmane Boulahrouf.

Qu'il me soit ici permis de vous remercier très sincèrement pour avoir accepté la responsabilité de ce travail malgré vos nombreuses obligations. Je suis très honorée d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos compétences tout au long de ces années de thèse.

Je tiens également à témoigner ma gratitude aux membres de jury.

Au professeur Ammar Benguedouar (Université Mentouri, Constantine) qui a accepté de présider ce jury, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au professeur Nouredine Karam (Université Es-sanial, Oran). Je suis très honorée de bénéficier de vos remarques éclairées et je tiens à vous assurer de ma grande estime et de ma profonde gratitude.

Au professeur Abdelhadi Ghechi (Université ferhat Abbas, Sétif). Je suis particulièrement honorée de votre présence à mon Jury de Thèse.

Au professeur Saad Saka (Université Badji Mokhta, Annaba). Qu'il me soit ainsi permis de vous remercier très sincèrement pour avoir accepté de juger ce travail

Un grand merci à tous les membres du laboratoire de « Génie Microbiologique et Applications » de l'université Mentouri de Constantine et plus particulièrement à Sihem Reghioia et à Habiba Zerizer.

Je tiens à remercier ma très chère amie Kounouz Rachedi qui s'est chargée de l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S de mes souches, ainsi que toute l'équipe « Environnement et Microbiologie » du CNRS ou s'est effectuée cette analyse, sans oublier Karima Kharroub qui m'a beaucoup aidé dans cette partie.

Je remercie également toute l'équipe du centre d'étude des substances naturelles à l'université Claude Bernard Lyon1 (sous la direction de Monsieur le professeur Gilles Comte), qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation des parties de purification et analyse structurale des molécules bioactives. Sans oublier Mr Touil de l'institut de chimie de l'université de Constantine pour ses aides.

Je dois ma profonde reconnaissance à ma très chère maman pour ses encouragements et ses prières, à mon cher mari à qui je dois mes encouragements les plus précieux ainsi que toute sa famille.

Que mes remerciements aillent aussi à mon cher papa, mes frères et sœurs et toute personne ayant participé de près ou de loin dans les résultats présentés dans cette thèse.

Liste des abréviations

2-DOS : cycle 2-déoxystreptamine
APCI : atmospheric pressure chemical ionisation
BET : bromure d'éthydiu
BLAST : basic local alignment search tool
CGMCC : china general microbiological culture collection
CIP : collection de l'institut Pasteur
DAP : acide diaminopimélique
dl : degrés de liberté
dNTP : désoxyribonucléotides
EDTA : ethylene diamine tetra acetic acid
F : statique du test de Fisher
g : gravité
ISP : international *Streptomyces* project
m/z : rapport masse sur charge
MC : sommes des carrés moyennes
MEGA : molecular evolutionary genetics analysis
MLS : macrolides, lincosamides et streptogramines
MRSA : methicilline resistant *Staphylococcus aureus*
NBRC : national biological resource center
PCR : polymerase chain reaction
PLP : protéines liant la pénicilline
psi : poids en système international
Rf : rapport frontal
RF : rectiflexible
S : unité Svedberg
TAE : tris- acétate EDTA
TBE : Tris-Borate-EDTA
uma : unité de masse atomique
VRE : vancomycine resistant *Enterococcus*

Liste des tableaux

Tableau 1. Nombre approximatif de métabolites secondaires produits par différents groupes d'organismes	page 15
Tableau 2. Antibiotiques de <i>Streptomyces</i> utilisés.....	page 16
Tableau 3. Caractéristiques culturales de la souche S1.....	page 36
Tableau 4. Utilisation des différentes sources de carbone par la souche S1.....	page 39
Tableau 5. Autres caractères physiologiques et biochimiques de la souche S1.....	page 40
Tableau 6. Espèces proches de la souche S1 et leurs degrés de similitude selon les résultats du BLAST.....	page 43
Tableau 7. Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S.....	page 45
Tableau 8. Comparaison des caractères phénotypiques de la souche S1 avec les espèces proches du groupe 116.....	page 47
Tableau 9. Caractéristiques culturales de la souche S2.....	page 48
Tableau 10. Utilisation des différentes sources de carbone par la souche S2.....	page 50
Tableau 11. Autres caractères physiologiques et biochimiques de la souche S2.....	page 52
Tableau 12. Espèces proches de la souche S2 et leurs degrés de similitude selon les résultats du BLAST.....	page 54
Tableau 13. Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S.....	page 56
Tableau 14. Comparaison des caractères phénotypiques de la souche S2 avec les espèces proches du groupe 43.....	page 57
Tableau 15. Analyse de la variance des effets de différents facteurs sur la production d'antibactériens.....	page 71
Tableau 16. Analyse de la variance des effets de différents facteurs sur la production d'antifongiques.....	page 72
Tableau 17. Résultat de la chromatographie sur papier des différents extraits organiques.....	page 89
Tableau 18. Résultat de la chromatographie sur couche mince des différents extraits organiques.....	page 90
Tableau 19. Activité antibactérienne de la fraction F1 par rapport à son extrait brut.....	page 97
Tableau 20. Activité antibactérienne des trois fractions d'HPLC de l'extrait S1AE.....	page 99
Tableau 21. Activité antibactérienne des trois fractions de l'extrait S2AE.....	page 104

Tableau 22. Activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait S2AE réunies.....page 105

Tableau 23. Activité antibactérienne des différentes collectes d'HPLC de l'extrait S2AEpage 109

Liste des figures

Figure 1. Classification des actinomycètes basée sur l'analyse des séquences ARN 16S.....	page 10
Figure 2. Dendrogramme simplifié représentant les principales classes taxonomiques du genre <i>Streptomyces</i> selon la classification numérique de Williams <i>et al.</i> (1983a).....	page 12
Figure 3. Structure du noyau β -lactame	page 20
Figure 4. Structure d'un glycopeptide (la vancomycine)	page 21
Figure 5. Structure de la fosfomycine.....	page 21
Figure 6. Structure des macrolides.....	page 22
Figure 7. Structure de la kanamycine (aminoglycoside contenant le cycle 2-DOS)	page 23
Figure 8. Structure de tétracycline.....	page 24
Figure 9. Structure de Chloramphénicol.....	page 24
Figure 10. Structure de la nystatine.....	page 25
Figure 11. Culture de la souche S1 sur milieux ISP2, ISP4 et ISP5.....	page 37
Figure 12. Observation microscopique de la souche S1 (grossissement X100)	page 38
Figure 13. Hydrolyse de la gélatine par la souche S1.....	page 41
Figure 14. Action des souches étudiées sur le lait écrémé.....	page 41
Figure 15. Résultats de l'électrophorèse des produits de la PCR des souches S1 et S2.....	page 42
Figure 16. Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S1.....	page 44
Figure 17. Culture de la souche S2 sur milieux Amidon caséine, Hickey et Tresner et ISP5.....	page 49
Figure 18. Bord de la colonie de la souche S2 sous microscope optique (Grossissement X 10)	page 50
Figure 19. Observation microscopique de la souche S2 (grossissement X100)	page 51
Figure 20. Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S2.....	page 55
Figure 21. Activité antibactérienne de la souche S1 mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar.....	page 63

Figure 22. Activité antibactérienne de la souche S2 mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar.....	page 64
Figure 23. Test d'activité des souches S1 et S2 contre <i>S. faecalis</i> 19433 sur différents milieux de culture (technique des cylindres d'Agar)	page 65
Figure 24. Test d'activité des souches S1 et S2 contre <i>S.aureus</i> Mu 50 sur différents milieux de culture (technique des cylindres d'Agar)	page 65
Figure 25. Activité antibactérienne des souches S1 et S2 mise en évidence par la technique de la double couche.....	page 66
Figure 26. Test d'activité des souches S1 et S2 contre <i>S.aureus</i> sur milieu Bennett (technique de la double couche)	page 67
Figure 27. Test d'activité des souches S1 et S2 contre <i>P.aeruginosa</i> sur milieu Bennett (technique de la double couche)	page 67
Figure 28. Activité antifongique de la souche S1 sur différents milieux de culture.....	page 69
Figure 29. Activité antifongique de la souche S2 sur différents milieux de culture.....	page 69
Figure 30. Effet moyen des milieux de culture sur l'ensemble des souches-tests dans la production d'antibactériens.....	page 71
Figure 31. Effet moyen des milieux de culture sur l'ensemble des souches-tests dans la production d'antifongiques.....	page 72
Figure 32. Cinétique de la production de substances antimicrobiennes par la souche S1.....	page 74
Figure 33. Cinétique de la production de substances antimicrobiennes par la souche S2.....	page 74
Figure 34. Courbe étalon pour le dénombrement de spores de la souche S.....	page 76
Figure 35. Courbe étalon pour le dénombrement de spores de la souche S2.....	page 76
Figure 36. Activités des extraits organiques du milieu liquide de la souche S1.....	page 82
Figure 37. Activités des extraits organiques du milieu liquide de la souche S2.....	page 82
Figure 38. Activités des extraits organiques du milieu solide de la souche S1.....	page 83
Figure 39. Activités des extraits organiques du milieu solide de la souche S2.....	page 83
Figure 40. Activités des extraits organiques de la souche S1 à différentes températures.....	page 85
Figure 41. Activités des extraits organiques de la souche S2 à différentes températures.....	page 86
Figure 42. Cinétique de l'activité antibactérienne des extraits organiques des souches S1 et S2.....	page 87

Figure 43. Schéma représentant les résultats des CCM de l'extrait S1AE après révélation sous UV aux deux longueurs d'onde.....	page 97
Figure 44. Spectre UV de la tache à Rf 0 de l'extrait S1AE donné par le densitomètre.....	page 98
Figure 45. Spectre UV de la tache à Rf 0 de l'extrait S1Tol donné par le densitomètre.....	page 98
Figure 46. Profil chromatographique de l'extrait brut S1AE après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes.....	page 100
Figure 47. Profil chromatographique de la fraction F1 après détection par absorbance en UV à 3 longueurs d'ondes.....	page 101
Figure 48. Schéma représentant les résultats des CCM dans le système toluène saturé de l'extrait S2AE en bidimensionnelle.....	page 102
Figure 49. Spectre UV de la fraction T1 donné par le densitomètre.....	page 103
Figure 50. Spectre UV de la fraction T3 donné par le densitomètre.....	page 103
Figure 51. Profil chromatographique de l'extrait brut S2AE après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes.....	page 106
Figure 52. Profil chromatographique de la fraction T1 après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes.....	page 107
Figure 53. Profil chromatographique de la fraction T3 après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes.....	page 108
Figure 54. Spectre UV-Visible de la fraction F1a.....	page 112
Figure 55. Spectre IR de la fraction F1a.....	page 114
Figure 56. Spectre de masse de la fraction (F1a) enregistré en APCI en mode positif.....	page 115
Figure 57. Structure de l'oganomycine GF.....	page 117
Figure 58. Spectre UV-Visible de la fraction T1c.....	page 118
Figure 59. Spectre UV-Visible de la fraction T3c.....	page 119
Figure 60. Spectre IR de la fraction T1c.....	page 120
Figure 61. Spectre IR de la fraction T3c.....	page 121
Figure 62. Spectre de masse de la fraction (T1c) enregistré en APCI en mode positif.....	page 123
Figure 63. Spectre de masse de la fraction (T3c) enregistré en APCI en mode positif.....	page 124
Figure 64. Structure de la paulomycine.....	page 125

Figure 65. Structure de 7- methoxydeacétylcéphalosporine C.....page 125

Table des matières

Introduction	page 1
Synthèse bibliographique	
1- Le genre <i>Streptomyces</i>	page 4
1-1- Définition et caractéristiques principales.....	page 4
1-2- Cycle de développement.....	page 5
1-3- Génétique.....	page 6
1-4- Écologie.....	page 7
1-5- Taxonomie.....	page 8
1-6- Bioactivité.....	page 13
2- Production d'antibiotiques par les <i>Streptomyces</i>	page 14
2-1- Généralités.....	page 14
2-2- Antibiotiques produits par les <i>Streptomyces</i>	page 15
2-2-1- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.....	page 20
2-2-2- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	page 22
2-2-3- Antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques.....	page 25
2-2-4- Antibiotiques antifongiques.....	page 25
Partie pratique	
Chapitre 1 : Identification des deux souches d'actinomycètes (S1 et S2)	
Matériel et méthodes	
1-Étude phénotypique	page 27
1-1- Préparation des inocula.....	page 27
1-1-1- Inoculum général.....	page 27
1-1-2- Inoculum lavé (pour milieu ISP9).....	page 27
1-2- Étude morphologique.....	page 27
1-2-1- Macromorphologie et caractères culturels.....	page 27
1-2-2- Micromorphologie.....	page 28
1-3- Étude physiologique et biochimique.....	page 28
1-3-1- Croissance à différentes températures.....	page 28
1-3-2- Croissance à différents pH.....	page 29
1-3-3- Tolérance au Chlorure de Sodium.....	page 29
1-3-4- Production de pigments mélanoides.....	page 29
1-3-5- Hydrolyse de l'amidon.....	page 30

1-3-6- Hydrolyse de la gélatine.....	page 30
1-3-7- Hydrolyse de la caséine.....	page 30
1-3-8- Action sur le lait écrémé.....	page 30
1-3-9- Utilisation des différents substrats carbonés.....	page 31
1-3-10- Réduction des nitrates.....	page 31
1-3-11- Production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S).....	page 32
1-3-12- Test du citrate.....	page 32
1-3-13- Test de décarboxylase.....	page 32
1-3-14- Dégradation de l'urée.....	page 32
1-3-15- Production d'indole.....	page 32
1-3-16- Recherche de la tryptophane désaminase.....	page 33
2- Étude phylogénétique.....	page 33
2-1- Extraction de l'ADN.....	page 33
2-2- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	page 33
2-2-1- Amplification des séquences des gènes codant l'ARNr 16S.....	page 33
2-2-2- Électrophorèse et purification des produits de la PCR.....	page 34
2-3- Séquençage.....	page 34
2-4- Analyse des séquences.....	page 34
Résultats et discussion	
1- Souche S1.....	page 35
1-1- Macromorphologie et caractères cultureux.....	page 35
1-2- Étude de la micromorphologie.....	page 35
1-3- Étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques.....	page 39
1-4- Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S.....	page 42
2- Souche S2.....	page 48
2-1- Macromorphologie et caractères cultureux.....	page 48
2-2- Étude de la micromorphologie.....	page 49
2-3- Étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques.....	page 49
2-4- Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S.....	page 53
Chapitre 2 : Mise en évidence des activités antimicrobiennes des souches S1 et S2	
Matériel et méthodes	
1- Activité antibactérienne.....	page 58
1-1- Préparation des inocula de bactéries-tests.....	page 58
1-2- Mise en évidence des activités antibactériennes.....	page 59

1-2-1- Technique des cylindres d'Agar.....	page 59
1-2-2- Technique de la double couche.....	page 59
2- Activité antifongique.....	page 60
2-1- Préparation des inocula de germes cibles.....	page 60
2-1-1- Inoculum levurien.....	page 60
2-1-2- Inoculum fongique.....	page 60
2-2- Mise en évidence des activités antifongiques.....	page 60
3- Étude statistique (Analyse de la variance (ANOVA) à trois facteurs).....	page 61
4- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes.....	page 61
Résultats et discussions	
1- Activité antibactérienne.....	page 61
1-1- Technique des cylindres d'Agar.....	page 61
1-2- Technique de la double couche.....	page 66
2- Activité antifongique.....	page 68
3- Étude statistique.....	page 70
3-1- Activité antibactérienne.....	page 70
3-2- Activité antifongique.....	page 70
4- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes.....	page 73
Chapitre 3 : Étude préliminaire des activités antibactériennes	
Matériel et méthodes	
1- Étude de la solubilité des substances bioactives.....	page 75
1-1- Extraction à partir du milieu liquide.....	page 75
1-1-1- Préparation des courbes d'étalonnage des souches d'actinomycètes.....	page 75
1-1-2- Culture en erlenmeyers agités.....	page 75
1-1-3- Préparation des extraits organiques.....	page 77
1-2- Extraction à partir de milieu solide.....	page 77
1-3- Technique des disques.....	page 77
2- Étude de la stabilité thermique des molécules bioactives.....	page 77
3- Étude de la cinétique de l'activité antibactérienne des extraits organiques.....	page 78
4- Étude du comportement chromatographique des molécules bioactives.....	page 78
4-1- Chromatographie sur papier.....	page 78
4-1-1- Révélation par les vapeurs d'iode.....	page 79
4-1-2- Révélation microbiologique des chromatogrammes.....	page 79
4-2- Chromatographie sur couche mince.....	page 79

Résultats et discussion

1- Étude de la solubilité des substances bioactives	page 80
1-1-Extraction à partir de milieu liquide.....	page 80
1-2- Extraction à partir de milieu solide.....	page 81
2- Étude de la stabilité thermique des molécules bioactives	page 84
3- Étude de la cinétique de l'activité antibactérienne des extraits organiques	page 87
4- Étude du comportement chromatographique des molécules bioactives	page 88
4-1- Chromatographie sur papier.....	page 88
4-2- Chromatographie sur couche mince.....	page 88

Chapitre 4 : Séparation et purification des molécules antibactériennes

Matériel et méthodes

1- Séparation et purification des molécules antibactériennes de la souche S1	page 92
1-1- CCM analytique bidimensionnelle.....	page 92
1-2- Comparaison des activités antibactériennes des deux extraits S1AE et S1Tol.....	page 92
1-3- CCM préparative.....	page 93
1-4- Purification par HPLC.....	page 93
1-4-1- HPLC analytique.....	page 93
1-4-2- HPLC préparative.....	page 94
2- Séparation et purification des molécules antibactériennes de la souche S2	page 94
2-1- CCM analytique bidimensionnelle.....	page 94
2-2- CCM préparative.....	page 94
2-3- Étude de l'effet synergique de l'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait S2A.....	page 95
2-4- Purification par HPLC.....	page 95
2-4-1- HPLC analytique.....	page 95
2-4-2- HPLC préparative.....	page 95

Résultats et Discussion

1- Souche S1	page 96
1-1- CCM analytique bidimensionnelle.....	page 96
1-2- Comparaison des deux extraits S1AE et S1Tol.....	page 96
1-3- CCM préparative.....	page 97
1-4- Purification par HPLC.....	page 99
1-4-1- HPLC analytique.....	page 99
1-4-2- HPLC préparative.....	page 99

2- Souche S2	page 102
2-1- CCM analytique.....	page 102
2-2- CCM préparative.....	page 104
2-3- Étude de l'effet synergique de l'activité antibactérienne des fractions T1, T2 et T3.....	page 104
2-4- Purification par HPLC.....	page 105
2-4-1- HPLC analytique.....	page 105
2-4-2- HPLC préparative.....	page 109

Chapitre 5 : Analyse structurale des molécules antibactériennes

Matériel et méthodes

1- Étude de l'absorbance UV-Visible à différents longueurs d'ondes	page 110
2- Étude de l'absorbance IR à différents longueurs d'ondes	page 110
3- Spectrométrie de masse	page 111

Résultats et discussion

1- Fraction F1a de la souche S1	page 111
1-1- Étude de l'absorbance UV-Visible à différents longueurs d'ondes.....	page 111
1-2- Analyse du spectre IR.....	page 113
1-3- Spectrométrie de masse.....	page 113
1-4- Essai d'identification des molécules antibactériennes de la fraction F1a.....	page 116
2- Fractions de la souche S2	page 117
2-1- Étude de l'absorbance UV-Visible à différents longueurs d'ondes.....	page 117
2-2- Analyse des spectres IR.....	page 117
2-3- Spectrométrie de masse.....	page 122
2-4- Essai d'identification des molécules bioactives de la souche S2.....	page 122

Conclusion générale et perspectives	page 127
--	----------

Références bibliographiques	page 130
--	----------

Annexes

Résumés

INTRODUCTION

Depuis que l'utilisation répandue de la chimiothérapie antimicrobienne a commencé dans les années 1950, il est apparu, grâce à la surveillance des résistances, que presque tous les microorganismes pathogènes avaient développé une résistance à des agents chimiothérapeutiques, ceci en grande partie en raison de leur mauvaise utilisation. Les molécules de pénicilline et de sulfamide, les premiers agents chimio-thérapeutiques couramment employés, connaissent aujourd'hui une utilisation plus limitée parce que beaucoup de microbes pathogènes y sont résistants. Même les organismes où toutes les souches restent sensibles à la pénicilline, comme *Streptococcus pyogenes* (bactérie responsable d'angine, de la scarlatine et de rhumatismes articulaires) exigent maintenant des doses plus fortes de pénicilline qu'il y a dix ans, pour une efficacité de traitement égale (**Madigan et Martinko, 2007**).

Quelques germes pathogènes ont développé une résistance à tous les agents antimicrobiens connus. Parmi ces derniers on peut recenser plusieurs souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA), d'*Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine (VRE) ainsi que des souches de *Mycobacterium tuberculosis* (**Livermore, 2004**). Un nombre croissant de souches MRSA résistantes à la vancomycine est apparu au Japon (**Hiramatsua et al., 1997**) puis aux USA (**CDCP, 1997**) et en France (**Poly et al., 1998**).

Devant cette situation alarmante, l'utilisation appropriée des antibiotiques restent absolument nécessaire pour prolonger la durée de validité clinique de ces molécules. Cependant, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules (**Madigan et Martinko, 2007 ; Saisivam et al., 2008**). Dans les années 1990, la découverte de métabolites bioactifs d'origine microbienne a progressé de manière exponentielle grâce aux progrès technologiques. Malheureusement, parmi les métabolites découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs. La découverte de nouvelles familles chimiques innovantes se raréfie (**Berdy, 2005**). Pourtant de nouveaux besoins émergent, des germes multi-résistants (**Sharma et al., 2005**) et de nouveaux virus apparaissent. Face à ces besoins, de nouveaux composés chimiques doivent donc être identifiés et la recherche de nouvelles molécules bioactives évolue.

Pour cela et en premier lieu, la biodiversité est exploitée. L'isolement de *Streptomyces* à partir d'écosystèmes extrêmes (où l'un ou plusieurs facteurs environnementaux sont extrêmes) comme la Sebkha (lac très salé) permet éventuellement, la découverte de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité (**Groth *et al.*, 1999 ; Rajan et Kannabiran, 2010**). En plus, l'utilisation de bactéries résistantes aux antibiotiques comme germes tests peut conduire à la découverte de molécules efficaces qui peuvent être nouvelles (**Oiwa, 1992 ; Rajan et Kannabiran, 2010**).

À ce titre, l'objectif premier de ce travail de thèse est l'étude de l'activité antibiotique de deux souches isolées de la Sebkha d'Ezzemoul, appartenant au genre *Streptomyces*. Mais au-delà de cet objectif primaire, cette étude est réalisée dans le but de caractériser les molécules bioactives, éventuellement, produites par ces souches. Le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces* (famille : *Streptomycetaceae*, ordre : *Actinomycetales*, classe : *Actinobacteria*), ces bactéries filamenteuses possèdent un métabolisme complexe et surtout très intense. En effet, depuis 1955 le genre *Streptomyces* est devenu et reste le grand fournisseur, non seulement, de nouveaux antibiotiques (**Hwang *et al.*, 2001 ; Marinelli, 2009**), mais également d'enzymes extracellulaires, d'herbicides, d'insecticides...

La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux *Streptomyces* et aux antibiotiques synthétisés par ce genre. La seconde partie est structurée en cinq chapitres composés chacun d'une partie illustrant les différentes techniques utilisées et d'une autre exposant, comparant et discutant les résultats obtenus :

- le chapitre 1 concerne l'identification morphologique, physiologique et biochimique des souches au niveau de l'espèce. Cette identification est complétée par le séquençage du gène codant l'ARNr 16S,

- dans le chapitre 2 nous nous intéressons à la mise en évidence des activités antibactérienne et antifongique sur différents milieux de culture tout en diversifiant les microorganismes-tests (sensibles et résistants) et les techniques employées,

- dans le chapitre 3, la cinétique de production, la stabilité thermique et le comportement chromatographique des molécules antibactériennes produites sur milieu liquide et solide après fermentation et extraction sont déterminés,

- le chapitre 4 regroupe les étapes de séparation et de purification des molécules bioactives par application des techniques chromatographiques sur couche mince (CCM) et liquide à haute performance (HPLC),

- le dernier chapitre concerne l'analyse structurale des molécules bioactives purifiées par des techniques de spectroscopie (absorbance en UV, absorbance en IR et spectrométrie de masse).

Enfin, la dernière partie rassemble la conclusion générale et met en évidence les perspectives de recherche.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Le genre *Streptomyces*

1-1- Définition et caractéristiques principales

Le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces*, c'est le genre d'actinomycètes le plus abondant et surtout le plus performant dans la production de métabolites secondaires importants. Les *Streptomyces* sont donc des organismes procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse. Cela explique leur dénomination : Du Grec Strepto.myces : *Streptos* : tordu ou courbé et *myces* : champignons (**Williams et al., 1989**). À cause de leur structure filamenteuse, les actinomycètes y compris les *Streptomyces* ont longtemps été sujets à controverse à propos de leur nature : certains les considérant comme des bactéries filamenteuses, d'autres comme des champignons. Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe est définitivement classé parmi les bactéries. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de l'acide diaminopimélique (**Lechevalier et Lechevalier, 1981**), en plus les *Streptomyces* n'ont pas de membrane nucléaire et sont sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens et le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (**Mariat et Sebald, 1990**).

Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria* (**Stackebrandt et al., 1997**). Ils possèdent un métabolisme oxydatif et un taux G+C% compris entre 69 et 78% (**Korn-Wendisch et Kutzner, 1992 ; Hodgson, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2006**). La présence de l'acide LL-diaminopimélique et de glycine et l'absence de sucres caractéristiques est typique pour ce type de paroi cellulaire (**Uchida et Seino, 1997 ; Stackebrandt et Schumann, 2006**).

Ils tendent à croître lentement en formant des filaments ramifiés de 0,5 à 2µm de diamètre qui fragmentent rarement c'est le mycélium végétatif ou mycélium de substrat. Le mycélium aérien forme par contre à sa maturité des chaînes de spores non mobiles. Leur croissance donne naissance à des colonies assez lisses au début qui deviennent poudreuses, floconneuses ou compactes après développement du mycélium aérien. Les *Streptomyces* produisent un grand nombre de pigments responsables des différentes

couleurs du mycélium en plus des pigments diffusibles. Leur température optimale est située entre 25°C et 35°C (à l'exception des espèces thermophiles ou psychrophiles) et leur pH optimum entre 6,5 et 8 (**Stackebrandt et Schumann, 2006**).

1-2- Cycle de développement

Le genre *Streptomyces* possède un cycle de développement complexe sur milieu solide : il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide (**Hodgson, 1992**). La germination de spores comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance, pour lesquelles le degré hygrométrique joue un rôle important. Parfois, l'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*. Puis le tube de germination croît et donne des hyphes qui se ramifient de manière apicale, l'ensemble de la colonie se développe de manière radiale. Le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments. C'est cette morphologie qui lui permet l'utilisation des substances solides dans les sols, ce qui permet aux *Streptomyces* la colonisation des substrats solides en comparaison avec les microorganismes unicellulaires et immobiles (**Miguelz et al., 2000**).

Une fois les nutriments épuisés, des branches spécialisées émergent à la surface des colonies formant le mycélium aérien qui se développe verticalement dans la partie aérienne. Une fois développé, le mycélium aérien couvre les colonies de surface en leur donnant un aspect poudreux, compact, poilu ou en chou fleur. C'est à cette étape la que la production de métabolites secondaire est généralement déclenchée (**Viollier et al., 2001**).

La formation du mycélium aérien est influencée par plusieurs facteurs, notamment : la composition du milieu de croissance, la température d'incubation et la présence de composés stimulant spécifiquement le mycélium aérien (**Pine, 1970 ; Madigan et Martinko, 2007**). Généralement, le mycélium aérien est plus épais et moins ramifié que le mycélium de substrat (**Silvey et Roach, 1975**), hydrophobe et contenant des pigments qu'on ne retrouve pas dans le mycélium végétatif. Le mycélium aérien se développe sur un milieu épuisé, ainsi pour croître, les cellules utilisent les éléments issus de la dégradation du mycélium végétatif. Cependant, les hyphes morts ne disparaissent pas complètement mais restent comme une partie de la structure coloniale ou elle joue un double rôle :

support mécanique pour le mycélium aérien et conducteur d'eau et de solutés à travers la colonie (**Miguel et al., 2000 ; Fernandez et Sanchez, 2002**). Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former de chaînes de spores uninucléées ; ces spores sont des agents de résistance et surtout de dissémination (**Hodgson, 1992**), ce qui règle le problème de l'immobilité du mycélium de substrat (**Miguel et al., 2000**). Les conidies peuvent, suivant les espèces, être produites en courtes ou longues chaînettes qui peuvent être ramifiées ou non, droite ou en spirales. Elles contiennent la plupart des éléments du mycélium primaire : Des ribosomes dissociables en sous-unités 30S et 50S, un système membranaire intracytoplasmique, des vacuoles, une membrane cytoplasmique, une paroi plus épaisse qui peut contenir jusqu'à trois couches mais leur contenu du génome est plus riche en ADN et moins en ARN que celui du mycélium de substrat. Ces spores contiennent des quantités plus importantes de potassium, de calcium et de manganèse que dans le mycélium de substrat et englobent souvent des pigments. Leur contenu en tréhalose, relativement abondant, aurait un rôle dans la dormance et la résistance des spores (**Mc Bride et Ensign, 1986**).

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certaines souches peuvent sporuler dans cet environnement (**Madigan et Martinko, 2007**). En milieu solide, une différenciation morphologique est donc observée tandis qu'en milieu liquide la différenciation est généralement physiologique (activation d'un métabolisme secondaire dans le cas d'un stress nutritionnel ou environnemental ralentissant significativement la croissance) (**Hodgson, 2000**).

1-3- Génétique

Le génome des *Streptomyces* est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que, plus classiquement, des plasmides circulaires. Une revue sur la génétique des Streptomycètes a été publiée par **Hopwood** en **1999**. Par ailleurs, les génomes de *Streptomyces coelicolor* A3(2), souche la plus communément étudiée en laboratoire, et celui de *Streptomyces avermitili*, souche utilisée dans l'industrie, ont été intégralement séquencés (**Bentley et al., 2002 ; Ikeda et al. 2003**).

1-4- Écologie

Les *Streptomyces*, si nombreux, se rencontrent presque partout (**Lacey, 1997**). Le sol à partir duquel ils peuvent coloniser de nombreux biotopes en est le réservoir le plus riche (**Xu et al., 1996 ; Katsifas et al., 1999 ; Dhanasekaran et al., 2009**). Ils représentent une partie significative de la population microbienne du sol dont le nombre diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente (**Waksman, 1963**). Comme beaucoup de microorganismes du sol, la plupart des *Streptomyces* se comportent en bactéries mésophiles (avec une croissance maximale à une température variant entre 25°C à 30°C) et neutrophiles (croissance entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité) (**Madigan et Martinko, 2007**). Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 colonisant ainsi les sols acides, ils ont la particularité de produire des hydrolases et des chitinases acides (**Alexander, 1977**). Dans le sol, les *Streptomyces* sécrètent des enzymes dégradant les polymères insolubles tels que les protéines, l'amidon, la cellulose et la lignine provenant des plantes et consomment les produits issus de la réaction de ces enzymes, en plus de la dégradation de la pectine, la kératine et la chitine. Ces produits apparaissent naturellement dans les litières en décomposition et dans les sols pour former l'humus. Leurs actions se situent également dans la dégradation des composts et des pollutions dues à l'activité de l'homme (**Lacey, 1997**). Certaines espèces peuvent même dégrader les hydrocarbures et le caoutchouc (**Madigan et Martinko, 2007**). Dans la rhizosphère, les *Streptomyces* jouent un rôle important dans la protection des racines des plantes par inhibition du développement des champignons potentiellement pathogènes par leur sécrétion d'antifongiques (**Doumbou et al., 2001 ; Samac et al., 2003 ; Prapagdee et al., 2008 ; Bouizgarne et al., 2009 ; Oskay, 2009**).

Les *Streptomyces* colonisent les eaux douces, ils produisent des composés volatiles responsables des goûts et des odeurs terreuses qui apparaissent parfois dans les eaux de consommation tels que la géosmine et la 2- méthyle- isobornéol (**Zaitlin et al., 2003 ; Madigan et Martinko, 2007**), selon **Cavala et Eberlin (1994)**, la production de ces substances est plus importante chez les espèces possédant un mycélium végétatif abondant. Les *Streptomyces* ont également été détecté dans les eaux marines mais à de faibles concentrations en comparaison avec les eaux douces (**Xu et al., 1996**) et dans l'air ou généralement ils sont présents sous forme de spores (**Reponen et al., 1998**).

Les *Streptomyces* sont capables de se développer sur une large gamme de substrats, selon **Andreyuk et al. (1990)**, Ils possèdent un grand pouvoir d'adaptation aux conditions de l'environnement et peuvent en même temps l'influencer, ainsi on les retrouve dans les eaux polaires gelées en permanence tout comme dans les sols chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols alcalins, les sols hautement contaminés par les métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés (**Goodfellows et Williams, 1983 ; Lechevalier, 1988 ; Sanglier et Trujillo, 1997 ; Hasavada et al., 2006 ; Lakshmipathy et Kanabiran, 2009**). Ils sont mêmes présents, comme espèces non pathogènes à la surface des feuilles d'arbres fruitiers comme les feuilles de vigne (**Vercesi et al., 1990**) et dans les racines de blé (**Coombs et Franco, 2003**) mais d'autres provoquent des dégâts considérables sur la pomme de terre (*S. scabis* et *S. acidiscabis* responsables de la gale de pomme de terre) (**Loria et al., 1997**). Par contre, ils semblent être absents des eaux minières très acides (pH<1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (**Xu et al., 1996 ; Hwang et al., 2001**).

1-5- Taxonomie

Le genre *Streptomyces* a été décrit pour la première fois par **Waksman et Henrici** en **1943** et classé dans la famille des *Streptomycetaceae* en se basant sur la morphologie et la composition de la paroi cellulaire. Le développement de la classification numérique a permis la reclassification de six autres genres de cette famille (*Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* et *Microellobosporia*) dans le genre *Streptomyces*. Ces anciens systèmes numériques utilisant les caractères phénotypiques sont fondamentalement changés par l'introduction des caractéristiques de la biologie moléculaire dans les systèmes de classification (**Stackebrandt et al., 1997**). Les genres *Streptomyces* et *Streptoverticillium* étaient deux genres distincts possédant des caractères morphologiques différents, en **1990**, **Witt et Stackebrandt**, ont conclu à partir des comparaisons des séquences d'ARNr 16S et 23S que le genre *Streptoverticillium* doit être considéré comme un synonyme de *Streptomyces*.

Kitasatospora était inclus dans le genre *Streptomyces*, mais la comparaison des gènes de l'ARN r 16S entier a prouvé la différence entre les deux (**Zhang et al., 1997**). On a également proposé d'inclure le genre *Kitasatospora* dans la famille *Streptomycetaceae* et plus récemment un troisième genre (*Streptacidiphilus*) est additionné (**Kim et al., 2003**).

La famille *Streptomycetaceae* contient actuellement trois genres (*Streptomyces*, *Kitasatospora* et *Streptacidiphilus*) (**Stackebrandt et Schumann, 2006**).

Kineosporia et *Sporichthya* présentent quelques similarités chimiotaxonomiques avec les membres du genre *Streptomyces*, ce qui a conduit à les classer tous dans le même genre (**Logan, 1994**). Ils sont ensuite considérés comme deux genres indépendants en se basant sur les séquences des ARN ribosomales: *Sporichthya* est un genre de la famille *Sporichthyaceae* du sous ordre *Frankineae* (**Stackebrandt et Schumann, 2006**) (**Figure 1**) et *Kineosporia* est réuni avec les *Kineococcus* (**Kudo et al., 1998**). Cependant, les problèmes de la classification à l'intérieur du genre ne sont pas encore résolus.

- **Détermination des espèces du genre *Streptomyces***

Le nombre d'espèces du genre *Streptomyces* a augmenté de 40 à plus de 3000, mais certaines d'entre elles étaient considérées comme synonymes. En 1964, le projet international des *Streptomyces* (ISP) a essayé de standardiser les critères de détermination de l'espèce. **Shirling et Gottlieb (1968a, b, 1969, 1972)** ont décrit des critères standards clés pour la détermination des espèces :

- la forme des chaînes de spores (réctiflexible pour les chaînes droites ou flexueuses, spirale pour les chaînes hélicoïdales) ;
- la couleur du mycélium aérien sporulé avec sept classes de couleur (blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet) ;
- la production de pigments mélanoides bruns à noirs ;
- l'ornementation de la paroi sporale (lisse, verruqueuses, échinelée ou chevelue) ;
- la présence ou non de pigments solubles ;
- la capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer (D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-raffinose, D-mannitol, D-fructose, L-arabinose, L-rhamnose, i-inositol et saccharose).

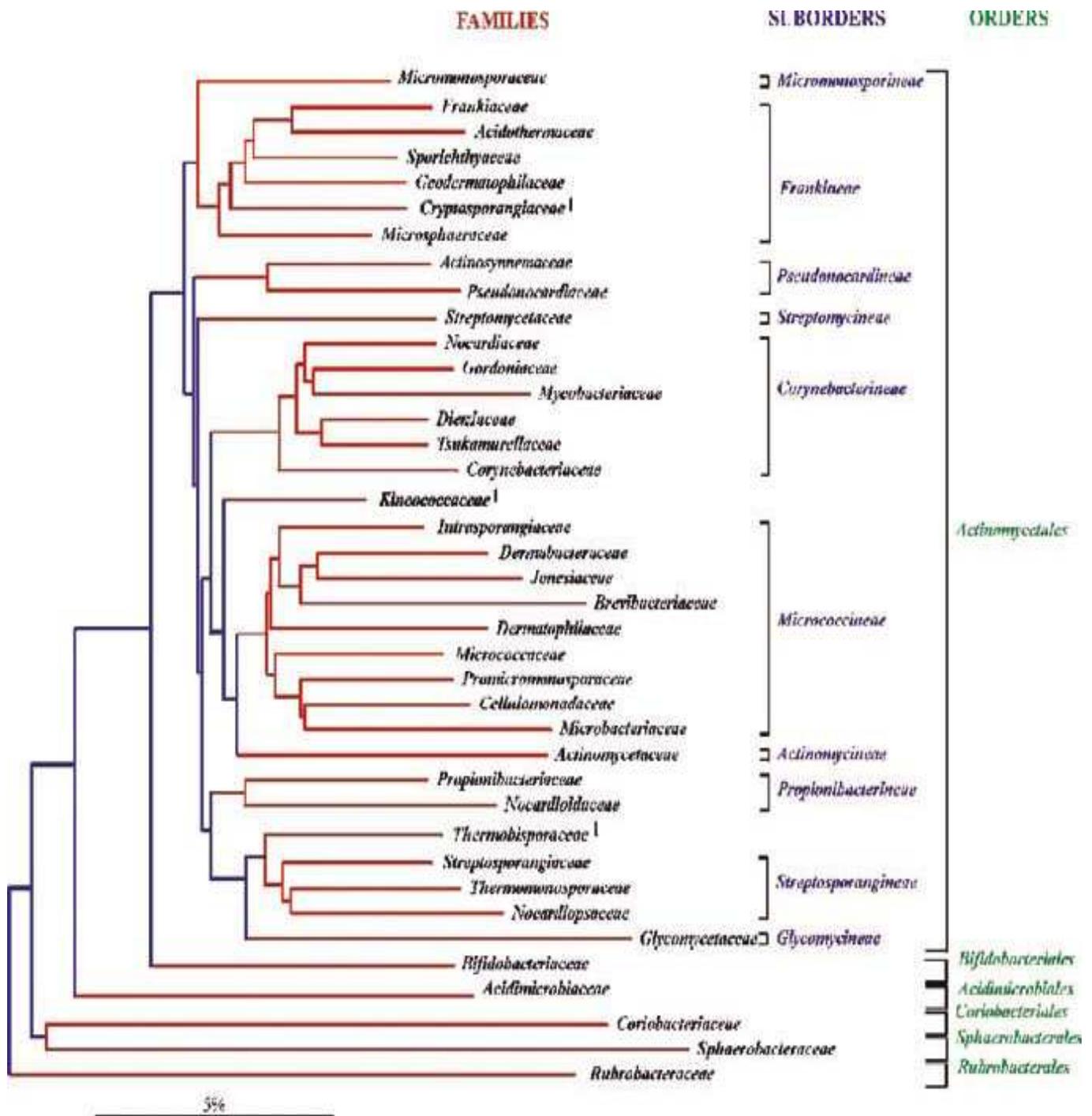


Figure 1. Classification des actinomycètes basée sur l'analyse des séquences ARN 16S (classification de Stackebrandt *et al.*, 1997, modifiée avec permission) (Stackebrandt et Schumann , 2006).

En **1983a**, **Williams et al.** ont utilisé la taxonomie numérique qui permet l'évaluation simultanée d'un grand nombre de caractères phénotypiques (**Figure 2**), l'étude est faite sur 475 souches (dont 394 *Streptomyces* souche type de l'ISP) en analysant 139 caractères. Les souches types (394) sont regroupées selon les similarités obtenues à partir des tests phénotypiques. Cette première étude taxonomique numérique a permis d'établir 19 classes majeures (contenant de 6 à 71 souches), 40 groupes mineurs (contenant moins de 5 souches) et 18 classes à souche unique. La plus grande classe (classe I) renferme 71 souches dont 44 sont des souches types, cette classe est ensuite divisée en trois sous classes : classe 1a, représentée par *Streptomyces albidoflavus* sous sp. *albidoflavus* (20 souches), classe 1b, représentée par *Streptomyces albidoflavus* sous sp. *anulatus* (38 souches), et classe 1c, représentée par *Streptomyces albidoflavus* sous sp. *halstedii* (13 souches) (**Williams et al., 1989**). Ainsi plusieurs espèces anciennement connues, sont considérées comme synonymes mais leurs noms sont toujours utilisés, par exemple, *S. griseus* est synonyme de *S. anulatus*, *S. lividans* et *S. violaceoruber*, et *S. hygroscopicus* est synonyme de *S. violaceoniger*. Il en résulte la diminution du nombre d'espèces décrites dans le *Bergey's Manual*, l'édition de 1989 a décrit 142 espèces (**Williams et al., 1989**) au lieu de 463 espèces décrites dans l'édition de 1974 (**Pridham et Tresner, 1974**). **Langham et al. (1989)** et **Kampfer et al. (1991)** ont essayé de reprendre le système de classification numérique de **Williams et al. (1983b)** en étudiant plus de caractères sur un plus grand nombre de souches, mais il s'est avéré que certains caractères (comme la résistance aux antibiotiques, la production de métabolites secondaires et la pathogénicité) ne peuvent être considérés comme des critères d'identification car ils peuvent résulter de phénomènes de transfert de gènes. Ainsi la majorité des caractères de **Williams et al. (1983a)** sont maintenus (**Anderson et al., 2001**).

Des méthodes moléculaires telles que la comparaison des séquences de l'ARNr 16S et 23S (**Stackebrandt et al., 1991a, b**) et l'hybridation ADN-ADN (**Labeda, 1992**) sont ensuite utilisées avec celles de la taxonomie numérique pour améliorer nos connaissances des relations inter-espèce au sein du genre *Streptomyces*.

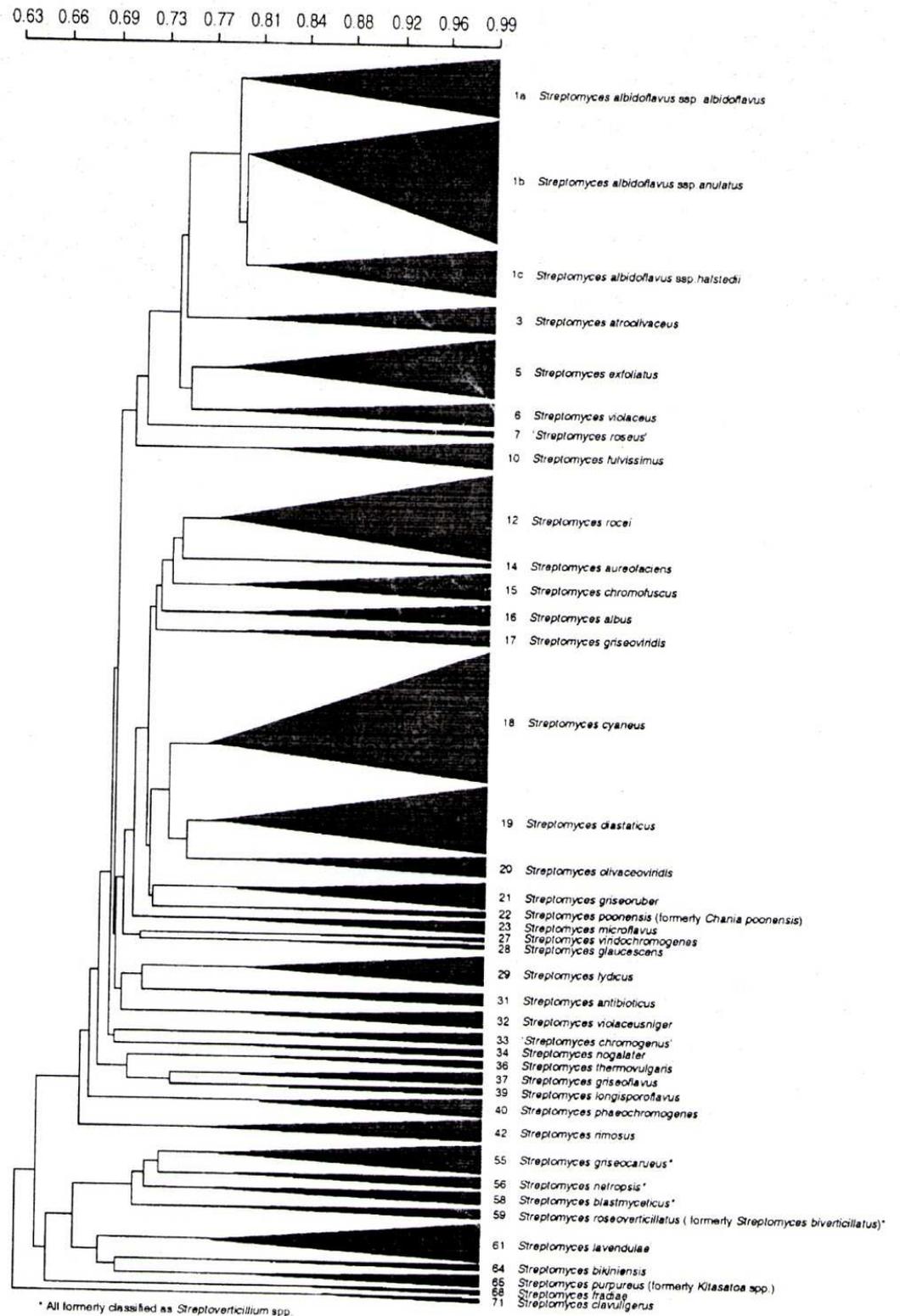


Figure 2. Dendrogramme simplifié représentant les principales classes taxonomiques du genre *Streptomyces* selon la classification numérique de Williams *et al.* (1983a) (Anderson *et al.*, 2001).

Récemment, **Labeda et al.** ont construit un arbre phylogénétique en rassemblant toutes les espèces répertoriées de *Streptomyces* jusqu'à 2011 (615 espèces) par le logiciel MEGA5, il en résulte 130 groupes dont les valeurs de bootstrap dépassent les 60%, ces chercheurs ont également cité la variation des caractères classiques au sein du même groupe (couleur et morphologie du mycélium aérien, forme de la spore) tout en mentionnant les membres des différentes classes de Williams *et al.* (**Labeda et al., 2012**).

Enfin, il est à noter que les deux moyens largement utilisés pour l'identification de ce genre bactérien, sont d'une part le suivi des aspects macroscopiques et des caractères culturels sur milieux de cultures spécifiques, et d'autre part, l'analyse de la séquence nucléotidique du gène ARNr 16S. Ces deux moyens ont permis l'identification de plusieurs souches appartenant à ce genre bactérien (**Mellouli et al., 2003 ; Fourati et al., 2005 ; Ben Ameer et al., 2006**).

1-6- Bioactivité

Les *Streptomyces* produisent 70 à 80% des substances bioactives naturelles connues à application pharmaceutique ou agrochimique (**Berdy, 2005 ; Manteca et al., 2008**). Continuellement de nouveaux métabolites à différentes activités biologiques sont isolés de souches *Streptomyces* (**Getha et al., 2005 ; Dastager et al., 2009 ; Oskay, 2009 ; Kang et al., 2010**). Le premier et le plus important produit des *Streptomyces* est les **antibiotiques** (**Watve et al., 2001**). À partir de 1955 le genre *Streptomyces* devient, et va rester le grand fournisseur d'antibiotiques nouveaux (**Hwang et al., 2001 ; Marinelli, 2009**). Ils constituent la source de substances antibactériennes, antifongiques (**Hopwood, 2007**), antitumorales, antiparasitaires (**Dietera et al., 2003 ; Hopwood, 2007 ; Lakshmipathy et al., 2009**), antivirales, insecticides, pesticides et herbicides, en plus des substances pharmacologiques comme les immuno-modulateurs (substances immunosuppressives et immunostimulantes), les substances vaso-actives et les agents neurologiques (**Sanglier et Trujillo, 1997 ; Petrosyan et al., 2003**).

Les enzymes sont les plus importants produits des *Streptomyces* après les antibiotiques (**Nascimento et al., 2002**), comme les protéases, les lipases, les cellulases, les amylases, les pectinases et les xylanases (**Vonothini et al., 2008 ; Syed et al., 2009**).

2- Production d'antibiotiques par les *Streptomyces*

2-1- Généralités

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes (**Marinelli, 2009**). Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

L'histoire des antibiotiques a débuté avec la découverte de la pénicilline par Fleming dans les années 40, depuis, les activités antimicrobiennes des antibiotiques produits par les microorganismes ont été considérablement étudiées, les recherches entreprises ont permis de compléter l'arsenal antibactérien mis à la disposition des médecins et du grand public. Des microorganismes producteurs de chloramphénicol, de néomycine, de tétracycline et de terramycine furent isolés dès 1953. La découverte des agents chimio thérapeutiques et le développement de nouveaux médicaments plus puissants ont révolutionné la médecine moderne et ont fortement diminué la souffrance humaine (**Prescott et al., 2007**).

Il est très bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs. Près de 50% des espèces de *Streptomyces* isolées sont reconnues comme productrices d'antibiotiques (**Madigan et Martinko, 2007**). Il apparaît clairement dans le **tableau 1** que les actinomycètes synthétisent les deux tiers des antibiotiques microbiens dont environ 80% sont isolés du genre *Streptomyces*. Même si on inclut les autres métabolites secondaires, les actinomycètes restent les plus grands fournisseurs avec environ 60% (les *Streptomyces* ont toujours la plus grande partie avec 80%). Plus de 60 substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie (**Madigan et Martinko, 2007**). L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (**Bentley et al., 2002 ; Ikeda et al., 2003**).

Tableau 1. Nombre approximatif de métabolites secondaires produits par différents groupes d'organismes (Kieser *et al.*, 2000).

Source	Métabolites bioactifs			Métabolites inactifs
	Antibiotiques	Autres	Total	
Non-actinomycètes	1400 (12%)	240 (9%)	1640 (11%)	2000-5000
Actinomycètes	7900* (66%)	1220* (40%)	9120* (61%)	8000-10000
Champignons	2600 (22%)	1540 (51%)	4140 (28%)	15000-25000
Total (micro-organismes)	11900 (100%)	3000 (100%)	14900 (100%)	25000-40000
Lichen	150	200-500		1000
Algue	700	800-900		1000-2000
Plantes supérieures	5000	25000-35000		500000-800000
Animaux terrestres	500	10000- 15000		200000-300000
Animaux marins	1200	1500-2000		2000-3000
Total (organismes supérieurs)	7500	35000-50000		>1000000

* environs 80% sont isolés de *Streptomyces* dans chaque catégorie.

2-2- Antibiotiques produits par les *Streptomyces*

Les *Streptomyces* synthétisent des antibiotiques appartenant à différents classes chimiques, ils sont fournisseurs d'oligosides, de β -lactamines, de peptides, de tétracyclines, d'anthracyclines, d'ansamycines, de macrolides, de polyènes, de nucléosides et de la fosfomycine. Le **tableau 2** détaille les antibiotiques synthétisés par les *Streptomyces*, leurs classes chimiques, leurs cibles d'action ainsi que leurs applications.

Tableau 2. Antibiotiques de *Streptomyces* utilisés (Kieser *et al.*, 2000 ; Madigan et Martinko, 2007).

Antibiotique	Producteur	Classe	Cible	Application
Acide clavulanique	<i>S.clavuligerus</i>	β -lactamine	Inhibiteur de β -Lactamase	Antibactérien
Actinomycine D	<i>S.sp</i>	Peptide	Transcription	Antitumorale
Antimycine A	<i>S.sp</i>	Macrolide	Système cytochrome	Insecticide
Avermectine	<i>S.avremitilis</i>	Macrolide	Chaine d'ions chlorures	Anthelminthe
Bambermycine	<i>S.bambergiensis</i>	Aminoglycoside substitué	Peptidoglycane	Favorise la Croissance des plantes
Bialaphos	<i>S.hygroscopicus</i>	Peptide	Glutamine synthétase	Herbicide
Bléomycine	<i>S.verticillus</i>	Glycopeptide	ADN	Antitumoral
Candidine	<i>S.griseus</i>	Macrolide polyène	Membrane (formation de pores)	Antifongique
Cephamicine	<i>S.sp</i>	β -lactamine	Peptidoglycane	Antibactérien
Chloramphénicol	<i>S.venezuelae</i>	N-dichloroacyl Phenylpropanoide	R	Antibactérien
Chlorotétracycline	<i>S.aureofaciens</i>	Tétracycline	R	Antibactérien
Cyclosérine	<i>S.orchidaceus</i>	Peptide cyclique substitué	Peptidoglycane	Antibactérien
Daptomycine	<i>S.roseosporus</i>	Lipopeptide	–	Antibactérien

Tableau 2. Antibiotiques de *Streptomyces* utilisés (suite).

Antibiotique	Producteur	Classe	Cible	Application
Daunorubicine (daunomycine)	<i>S.peucetius</i>	Anthracycline	Intercalaire d'ADN	Antitumoral
Desferrioxamine	<i>S.pilosus</i>	Peptide	Chélateur de fer	Régulateur des concentrations en fer
Doxorubicine (adriamycine)	<i>S.peucetius</i> <i>var.caesius</i>	Anthracycline	Intercalaire d'ADN	Antitumoral
K506(tacrolmus)	<i>S.hygroscopicus</i>	Macrolide	Reliure des protéines FK	Immunosuppresseur
Fosfomycine	<i>S.sp</i>	Ac. phosphonique	Peptidoglycane	Antibactérien
Hygromycine B	<i>S.hygroscopicus</i>	Aminoglycoside substitué	R	Antihelminthe
Kanamycine	<i>S.kanamyceticus</i>	Aminoglycoside	R	Antibactérien
Lasalocide	<i>S.lasaliensis</i>	Polyether	Membrane (ionophore)	Antibactérien
Lincomycine	<i>S.lincolnensis</i>	Aminoglycoside	R	Antibactérien
Milbemycine	<i>S.hygroscopicus</i>	Macrolide	Chaine d'ions chloride	Antiparasitaire
Mithramycine	<i>S.argillaceus</i>	Ac.auréolique	Alkylation d'ADN	Antitumoral
Mitomycine C	<i>S.caespitosus</i> <i>S.verticillatus</i>	Anthracycline	ADN	Antitumoral
Monensin	<i>S.cinnamonensis</i>	Polyéther	Membrane (ionophore)	Antibactérien
Natamycine	<i>S.nataensis</i>	Polyène tetraène	Membrane (formation de pores)	Antifongique

Tableau 2. Antibiotiques de *Streptomyces* utilisés (suite).

Antibiotique	Producteur	Classe	Cible	Application
Néomycine	<i>S.fradiae</i>	Aminoglycoside	R	Antibactérien
Nikkomycine	<i>S.tendae</i>	Nuléoside	Biosynthèse de chitine	Antifongique, insecticide
Nosiheptide	<i>S.actuosis</i>	Thiopeptide	R	Favorise la Croissance des plantes
Novobiocine	<i>S.niveus</i>	Glycoside	ADN	Antibactérien
Nystatine	<i>S.noursei</i>	Macrolide polyène	Membrane	Antifongique
Oleandomycine	<i>S.antibioticus</i>	Macrolide	R	Antibactérien
Oxytétracycline	<i>S.rimosus</i>	Tétracycline	R	Antibactérien
Paromomycine	<i>S.rimosus</i>	Aminoglycoside	R	Antiparasitaire
Phleomycine	<i>S.verticillus</i>	Glycopeptide	ADN	Antitumoral
Polyoxine	<i>S.cacaoi</i> <i>var.asoensis</i>	Nucléoside-peptide	Biosynthèse de chitine	Antifongique (protecteur de plante)
Pristinamycine	<i>S.pristinaespiralis</i>	Peptide macrolactone	R	Antibactérien
Puromycine	<i>S.alboniger</i>	Purine nucléoside	ADN	Antitumoral
Rapamycine	<i>S.hygroscopicus</i>	Macrolide	Liaison des protéines FK	Immunosuppresseur
Salinomycine	<i>S.albus</i>	Polyéther	Membrane (ionophore)	Antibactérien
Spectinomycine	<i>S.spectabilis</i>	Aminocyclitol	R	Antibactérien
Spiramycine	<i>S.ambofaciens</i>	Macrolide	R	Antibactérien

Tableau 2. Antibiotiques de *Streptomyces* utilisés (suite).

Antibiotique	Producteur	Classe	Cible	Application
Streptogramine	<i>S.graminofaciens</i>	Lactones macrocyclique	R	Antibactérien
Streptomycine	<i>S.griseus</i>	Aminoglycoside	R	Antibactérien
Streptothricine	<i>S.lavendulae</i>	N-glycoside	R	Favorise la Croissance des plantes (protecteur de plante)
Tétracycline	<i>S.aureofaciens</i>	Tétracycline	R	Antibactérien
Thienamycine	<i>S.cattleya</i>	β -lactamine	Peptidoglycane	Antibactérien
Thiostrepton	<i>S.azureus</i>	Thiopeptide	R	Favorise la Croissance des plantes
Tobramycine	<i>S.tenebrarius</i>	Aminoglycoside	R	
Tylosine	<i>S.fradiae</i>	Macrolide	R	Antibactérien
Validamycine	<i>S.hygroscopicus</i>	Aminoglycoside	R	Favorise la Croissance des plantes
Virginiamycine	<i>S.virginiae</i>	Lactone macrocyclique	R	Favorise la Croissance des plantes (Protecteur de plante)

R : l'antibiotique se lie au ribosome bloquant ainsi la synthèse protéique.

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. La classification des antibiotiques en tenant compte du spectre antimicrobien ne parait pas être la meilleure en raison de l'évolution de la résistance bactérienne. La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupes assez homogènes mais éloignés des objectifs cliniques. Enfin, celle basée sur le mécanisme d'action rend compte des propriétés particulières de chaque groupe d'antibiotiques. Actuellement, les molécules antibactériennes de *Streptomyces* disponibles

agissent en priorité au niveau de la biosynthèse et le maintien de la paroi cellulaire, des protéines et de l'ADN bactérien (Walsh, 2000).

2-2-1- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

Trois classes d'antibiotiques sont concernées : les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine.

- **Structure et mode d'action des β -lactamines**

Les β -lactamines se fixent sur des protéines de la membrane cytoplasmique, les PLP (protéines liant la pénicilline), ce sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane : les transpeptidases, les carboxypeptidases et les transglycosylases. Les β -lactamines bloquent leur fonctionnement inhibant ainsi la formation du peptidoglycane. Cette inhibition entraîne le blocage de la multiplication cellulaire. Le peptidoglycane est dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne (Calamita et Doyle, 2002 ; Prescott *et al.*, 2007).

Les β -lactamines sont caractérisés par un cycle β -lactame à quatre liaisons (Figure 3), ceux synthétisés par les *Streptomyces* regroupent les β -lactamines proprement dit comme la Thienamycine, en plus des inhibiteurs des β -lactamases (comme l'acide clavulanique), ils possèdent un noyau β -lactame mais n'ont pas d'activité antibactérienne propre, ils inhibent de manière irréversible l'activité des β -lactamases des bactéries à coloration de Gram positive et négative (Madigan et Martinko, 2007).

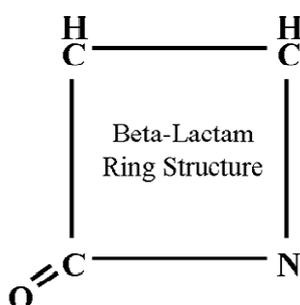


Figure 3. Structure du noyau β -lactame.

- **Structure et mode d'action des glycopeptides**

Les glycopeptides sont des molécules complexes, constitués d'un heptapeptide cyclique sur lequel vient se fixer des sucres (**Figure 4**). Les glycopeptides sont au même titre que les β -lactamines des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leur fixation sur la membrane cytoplasmique entraîne une inhibition de la transglycosylase et la transpeptidase nécessaire à la bonne synthèse du peptidoglycane (**Prescott *et al.*, 2007**).

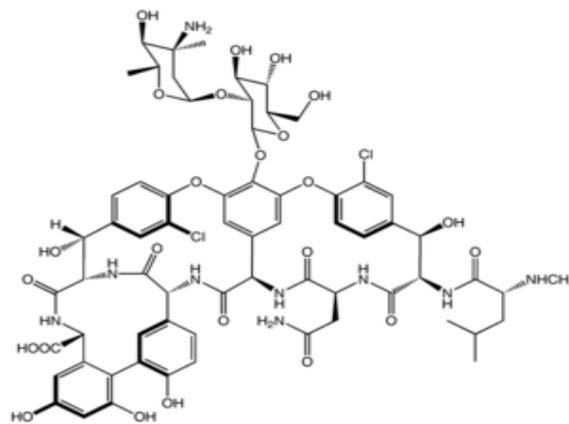


Figure 4. Structure d'un glycopeptide (la vancomycine).

- **Structure et mode d'action de la fosfomycine**

La fosfomycine est un acide phosphonique (**Figure 5**), elle agit sur les étapes précoces de la synthèse du peptidoglycane, en bloquant la formation de l'acide N-acétyl muraminique, l'un des constituants essentiels du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Cet antibiotique est isolé la première fois à partir de *Pseudomonas syringae*. Depuis tous les organismes producteurs de fosfomycine appartiennent aux *Streptomyces* (**Oiwa,1992**).

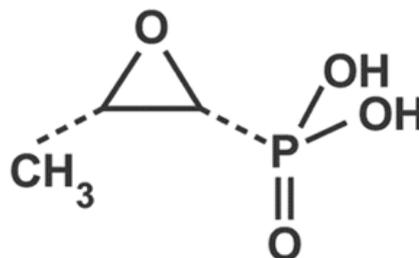


Figure 5. Structure de la fosfomycine.

2-2-2- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Les antibiotiques les plus importants sont les macrolides, les aminoglycosides, les tétracyclines et les phénicolés.

- **Macrolides et apparentés (MLS)**

Le nom « macrolide » vient de macro (grand) et olide (lactone ou ester intracyclique). Ils possèdent un large noyau lactonique central de 12 à 16 chaînons sur lequel se greffent des sucres neutres ou aminés (**Figure 6**). Le cycle lactone est substitué par des groupements alkyles ou hydroxyles. En plus des macrolides des *Streptomyces*, il existe des semi synthétiques obtenus par modification chimique des produits naturels (**Labro, 2002**).

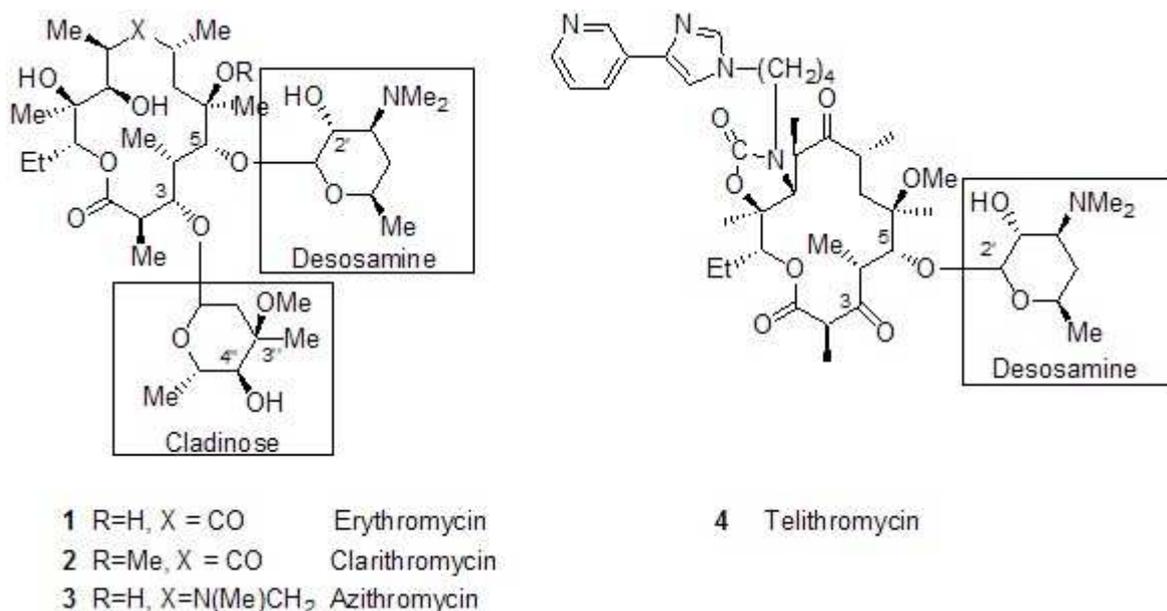


Figure 6. Structure des macrolides.

Les macrolides constituent avec les lincosamides et les streptogramines (ou synergistines lorsqu'ils sont formés des deux composés A et B) une famille d'antibiotiques : les MLS, de structure différente mais possèdent des mécanismes d'action et un spectre antibactérien similaire. Les lincosamides sont constitués d'un acide aminé, la L-proline, substitué par une chaîne alkyle en position 4, et d'un sucre comportant un atome de soufre (lincosamine), relié entre eux par une liaison amide. Les streptogramines A sont des macrolactones cycliques polyinsaturées alors que streptogramines B sont des hexadepsipeptides cycliques (**Canu et Leclerq, 2001**).

Les macrolides et apparentés (MLS) agissent sur la synthèse protéique, la fixation de ces molécules sur le ribosome entraîne l'inhibition de l'élongation du peptide en formation.

- **Aminoglycosides**

La principale caractéristique des aminoglycosides réside dans le cycle 1,3 diaminocyclohexanetriol (streptamine) ou, lorsque dans la majorité des cas ce cycle est privé de la fonction hydroxyle en position 2, le cycle 2-déoxystreptamine (2-DOS) (**Figure 7**) (**Herman, 2005**).

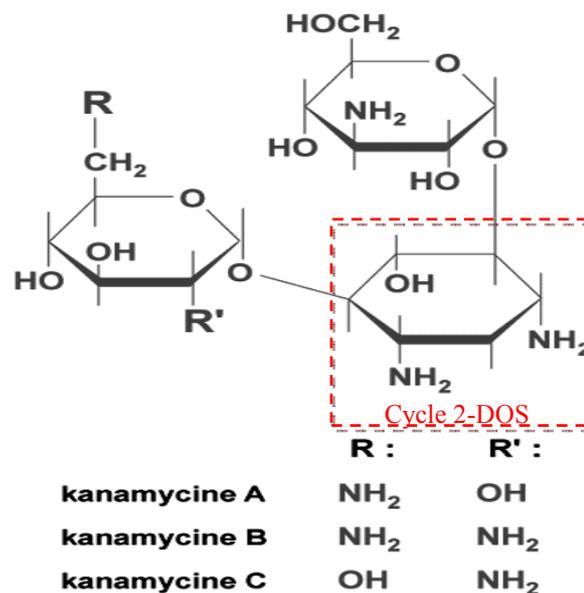


Figure 7. Structure de la kanamycine (aminoglycoside contenant le cycle 2-DOS).

Les aminoglycosides ont pour cible cellulaire principale la sous unité 30S du ribosome bactérien, après fixation, ils faussent le mécanisme de lecture de l'ARNm à traduire favorisant l'incorporation d'acides aminés erronés dans les protéines au cours de synthèse, ce qui provoque une accumulation des protéines incorrectement traduites dans la bactérie (**Carter et al., 2000 ; Madigan et Martinko, 2007**).

- **Tétracyclines**

Les tétracyclines possèdent une structure particulière, elles sont formées de 4 cycles accolés sur lesquels sont fixées diverses chaînes latérales (**Figure 8**). Ces antibiotiques inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l' aminoacyl-ARNt à la sous unité 30S du ribosome bactérien (**Prescott *et al.*, 2007**).

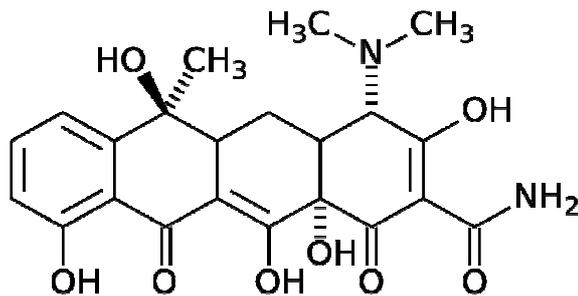


Figure 8. Structure des tétracyclines.

- **Phénicolés**

Ce sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteur aussi d'un phényle substitué. Le plus connu est le chloramphénicol (**Figure 9**). Comme les macrolides et les lincosamines, les phénicolés se fixent à la sous unité 50S du ribosome bactérien. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la réaction de transpeptidation (**Prescott *et al.*, 2007**).

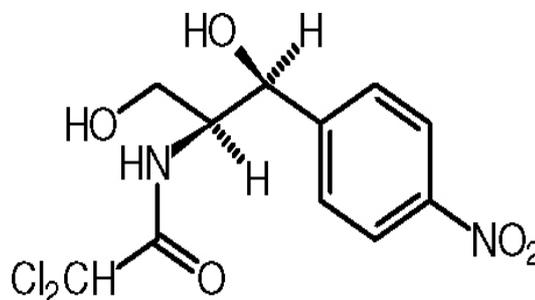


Figure 9. Structure de Chloramphénicol.

Identification des deux souches d'actinomycètes (S1 et S2)

Les souches d'actinomycètes servant d'objet de ce travail ont été isolées d'échantillons d'eau de la Sebka d'Ezzemoul*, dans des travaux antérieurs (**Boughachiche *et al.*, 2005**), identifiées au genre *Streptomyces* et conservées au niveau du laboratoire. Il est évident pour la suite de nos travaux, **d'identifier** ces deux souches au niveau de l'espèce. Pour cela et en plus des méthodes d'identification préconisées par le projet international sur les *Streptomyces*, nous étudierons les séquences des gènes codant l'ARNr 16S.

Un des buts de cette détermination taxonomique est en fait de connaître le matériel bactérien sur lequel nous travaillons et surtout de savoir si ce microorganisme est déjà décrit dans la littérature scientifique. Une telle situation nous permettra d'obtenir des informations supplémentaires sur les actinomycètes et produits actifs connus qu'ils synthétisent éventuellement. Ces renseignements pourront être d'un précieux recours lors de l'identification des substances actives produites par les deux souches de *Streptomyces*.

* La Sebka d'Ezzemoul est localisée dans Wilaya de Oum El Bouaghi et située dans la dépression formée par la gamme côtière des montagnes, au nord la Kabylie et au sud le massif de l'Aurès (longitude 6° 30' à 6° 35'Est, latitude 35° 50' à 35° 55'Est).

Matériel et méthodes

1- Étude phénotypique

1-1- Préparation des inocula

1-1-1- Inoculum général

Les souches d'actinomycètes conservées dans une solution de glycérol à -20°C, sont ensemencées sur milieu gélosé ISP4. Après 14 jours d'incubation à 28 °C, des suspensions denses de fragments mycéliens et de spores sont préparées en eau physiologique stérile. Ces inocula sont utilisés immédiatement et servent à l'ensemencement des différents milieux à l'exception du milieu ISP9.

1-1-2- Inoculum lavé (pour milieu ISP9)

Des erlenmeyers de 250 ml contenant 50ml du milieu ISP1 sont ensemencées à raison de 10% avec l'inoculum général de chaque souche puis incubées dans un bain marie agitateur « Certomat » à 250 rpm pendant 72 h à 28°C. Les cellules sont centrifugées stérilement pendant 10 mn à 13 000 g. Les surnageants sont écartés et les culots des deux souches sont lavés deux fois à l'eau distillée stérile. C'est cette suspension qui sert d'inoculum, elle est utilisée immédiatement pour l'ensemencement du milieu ISP9.

1-2- Étude morphologique

1-2-1- Macromorphologie et caractères cultureux

Les milieux utilisés pour cette étude sont :

- ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 (**Shirling et Gottlieb, 1966**);
- Amidon caséine (**Mackay, 1977**) ;
- Glucose asparagine (**Xu et al., 1996**) ;
- Hickey et Tresner (**Lee et al., 2000**).

Pour chaque souche, trois boîtes de chaque milieu sont ensemencées avec l'inoculum général selon la méthode préconisée par **Shirling et Gottlieb (1966)** : trois traits parallèles sont effectués à partir d'une goutte de suspension de l'inoculum déposé sur le bord de la gélose. Les boîtes sont incubées à 28°C et après 7, 14 et 21 jours d'incubation, l'importance de la croissance de chaque souche, le développement et la pigmentation du mycélium aérien, la pigmentation du mycélium de substrat (dos de la colonie) et la présence de pigments diffusibles sur chaque milieu sont observés.

1-2-2- Micromorphologie

- **Technique de culture sur lame (Zaitlin *et al.*, 2003)**

Les deux souches sont ensemencées à raison d'une goutte d'inoculum sur une portion rectangulaire d'Agar de 1cm x 1cm x 2 mm d'un milieu solide ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5. Ce rectangle est déposé sur une lame puis recouvert avec une lamelle. Les cultures sous forme de sandwich sont incubées à 28°C pendant 14 jours. L'observation se fait sous microscope optique à différents grossissements.

- **Technique de culture sur lamelle (Williams et Cross, 1971 ; Holt *et al.*, 1994)**

Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé (ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5) de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec celui-ci. Une goutte de chaque inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose entraînant quelques fragments du mycélium, elle est ensuite déposée sur la lame et examinée au microscope optique à différents grossissements.

1-3- Étude physiologique et biochimique

1-3-1- Croissance à différentes températures

Des erlenmeyers de 250ml contenant 50ml de bouillon nutritif sont ensemencés à raison de 1% de l'inoculum de chaque souche puis incubés à différentes températures (0, 22, 30, 37, 45 et 55°C) pendant 7 jours avec une agitation de 250 rpm. La croissance des souches est estimée par mesure du poids sec cellulaire de chaque souche aux différentes températures testées.

1-3-2- Croissance à différents pH

Les deux souches S1 et S2 sont ensemencées en touches sur milieu CYD tamponné à différents pH (5,5 - 6 - 6,5 - 7 - 7,5 - 8) par des solutions K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 à 100mM (Crawford *et al.*, 1993). La croissance des deux souches est évaluée visuellement 5 à 7 jours d'incubation à 28°C. Trois niveaux d'appréciation sont retenus:

- Croissance faible ou absente (+/-) ;
- Croissance moyenne (+ ou ++)
- Bonne croissance (+++).

1-3-3- Tolérance au Chlorure de Sodium

Ce test est réalisé sur bouillon nutritif contenant 7% (P/V) de glycérol repartis à raison de 10ml par tube et contenant des concentrations croissantes de chlorure de sodium (0, 3, 5, 6, 7, 9, et 10% (P/V) (Chaphalkar et Dey, 1996). Après ensemencement, les tubes sont incubés à 28°C pendant 14 jours d'incubation sous agitation 250 rpm. La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la dernière concentration permettant encore une croissance.

1-3-4- Production de pigments mélanoides

La mise en évidence de la production de ces pigments est réalisée par culture des souches sur deux milieux solides : ISP6 et ISP7. La production de pigments bruns diffusibles est appréciée après deux à quatre jours d'incubation à 28°C. Des milieux témoins non ensemencés mais incubés dans les mêmes conditions servent de références négatives. Le pigment brun extra cellulaire est également recherché après deux à quatre jours de culture en milieu ISP1 liquide utilisé pour la préparation de l'inoculum lavé.

L'influence d'une modification de pH, sur les pigments intracellulaires ou diffusibles est recherchée par l'emploi d'une solution de NaOH (0,05N) et d'une solution d'HCl (0,05N). Pour tester les pigments intracellulaires, deux parcelles de culture sont découpées puis déposées sur une lame propre. Après avoir éliminé le maximum de gélose, une goutte

de la solution acide est déposée au dos de l'une des colonies, l'autre recevant une goutte de la solution basique. Après 10 à 15 mn, toute modification de la coloration est notée (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Dans le cas d'un pigment diffusible, l'acide ou la base est déposé, directement, sur la gélose colorée.

1-3-5- Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% (P/V) d'amidon soluble. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte par une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Geraldine et al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

1-3-6- Hydrolyse de la gélatine

Les souches sont ensemencées sur une gélose nutritive contenant 0,4% (P/V) de gélatine puis incubées 14 jours à 28°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (**Geraldine et al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

1-3-7- Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. Les boîtes ensemencées sont observées après 14 jours d'incubation à 28°C. La clarification de la gélose autour des colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine (**Geraldine et al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

1-3-8- Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de 10% de lait écrémé en poudre en eau distillée sont ensemencés et incubés à 28°C. Après 14 jours, la coagulation et la peptonisation sont notées (**Singleton, 1999**).

1-3-9- Utilisation des différents substrats carbonés

L'étude de l'utilisation des sources de carbone est réalisée sur le milieu de base gélosé ISP9. Les différents substrats testés sont : le glucose, le saccharose, l'arabinose, le galactose, le fructose, le maltose, le lactose, le mannose, la xylose, les dextrines, le mannitol, l'inositol, le rhamnose, le raffinose et la cellulose. Ces substrats en solutions aqueuses à 10% sont tous stérilisés par filtration sur membrane millipore (0.22). Seuls la cellulose et l'inositol sont stérilisés par immersion pendant une nuit dans de l'éther éthylique (**Shirling et Gottlieb, 1966**) et sont réintroduits dans de l'eau distillée stérile après évaporation du solvant. Les différentes sources de carbones sont ajoutées au milieu de base stérilisé encore en surfusion, afin d'obtenir une concentration finale de 1% (P/V). Après ensemencement des milieux avec l'inoculum lavé, les lectures s'effectuent après 14 jours d'incubation à 28°C. L'utilisation des différents substrats est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur le milieu servant de contrôle positif (milieu ISP9 contenant 1% de glucose) et avec le contrôle négatif (milieu ISP9 sans la source de carbone).

1-3-10- Réduction des nitrates

10ml de bouillon nutritif contenant 0,1% de nitrate de potassium sont ensemencés et incubés à 28°C. Au 5^e, 10^e et 14^e jour d'incubation, trois gouttes des réactifs de Griess I et II sont ajoutées à 1ml de culture.

La réduction de nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés (**Singleton, 1999**) :

- l'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche);
- en absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au delà du stade des nitrites).

1-3-11- Production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

Des tubes contenant du milieu TSI sont ensemencés puis incubés pendant 14 jours à 28°C. La production de l'H₂S est appréciée par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu (**Guiraud, 1998**).

1-3-12- Test du citrate

Ce test détermine la capacité qu'a un organisme d'utiliser le citrate comme seule source de carbone. Des cultures de souches *Streptomyces* sur milieu citrate de Simmons incubées à 28°C sont observées quotidiennement jusqu'au 14^e jour. La coloration du milieu en bleu traduit l'utilisation du citrate par les souches (**Guiraud, 1998**).

1-3-13- Test de décarboxylases

Des tubes du milieu Moeller (arginine, lysine, ornithine et témoin) sont ensemencés et incubés pendant 14 jours à 28°C. Chaque tube reçoit le même nombre de gouttes (goutte à goutte) d'un tampon phosphate (pH4) jusqu'à virage acide du tube témoin (coloration jaune). Les milieux restés alcalins (coloration mauve) reçoivent trois gouttes supplémentaires du tampon, le virage de la couleur au jaune signifie un test négatif (**Guiraud, 1998**).

1-3-14- Dégradation de l'urée

Les souches de *Streptomyces* possédant des uréases sont recherchées en utilisant le milieu urée-indole, après culture, ces milieux prennent une teinte rouge si l'urée est dégradée (**Guiraud, 1998**).

1-3-15- Production d'indole

La recherche d'indole est réalisée sur des cultures jeunes de *Streptomyces* sur milieu urée-indole, en utilisant des gouttes du réactif de Kovacs. L'apparition d'un anneau rouge en surface indique un test positif (**Guiraud, 1998**).

1-3-16- Recherche de la tryptophane désaminase

Les deux souches *Streptomyces* sont ensemencées sur milieu urée-indole, la recherche de la tryptophane désaminase est réalisée sur des cultures de 24 heures en ajoutant une goutte d'acide chlorhydrique N/5 et une goutte de perchlorure de fer à 10%. L'apparition de la coloration brune indique un test positif. Le test est considéré comme négatif pour une coloration jaune (Guiraud, 1998).

2- Étude phylogénétique

2-1- Extraction de l'ADN

Des cultures de 48h en milieu liquide des deux souches étudiées sont centrifugées à 10000 g pendant 30 secondes. Le culot est lavé avec 0,5ml de Tris-EDTA à pH égal à 8. Une deuxième puis une troisième centrifugation à sec à 10000 g pendant 30 secondes sont réalisées. Après élimination du surnageant, l'extraction de l'ADN est réalisé selon le protocole du kit «Ultraclean Microbial DNA Isolation (Mo Bio)».

2-2- Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action d'une ADN polymérase thermostable. La séquence choisie dans cette étude est le gène ribosomal 16S (1500 paires de bases). Très représenté dans les banques de données, ce qui nous permettra d'affilier nos séquences à une espèce de *Streptomyces* connue.

2-2-1- Amplification des séquences des gènes codant l'ARNr 16S

Les gènes codant l'ARN ribosomal 16S des souches sont amplifiées par utilisation des amorces (ou primers) 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') et 1387R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC- 3'). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type « AB Applied Biosystems Veriti 96 well thermal cycler », la composition du milieu de réaction est la suivante : ADN (1µl), mélange du couple d'amorces à 20µM (1 µl), Taq polymerase (0,5 µl), dNTP 20mM (1µl), MgCl₂ (2 µl), tampon « Eurobio » (1 µl). L'opération débute par une dénaturation initiale à 95°C pendant 10mn suivie de 36 cycles

de PCR à 95°C, 56°C (pendant 45 secondes) et 72°C (pendant une minute) et enfin terminée par une élongation à 72°C pendant 10 mn.

2-2-2- Électrophorèse et purification des produits de la PCR

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose contenant 35 ml de Tris-Borate-EDTA (TBE) à 1M, 0,35g d'agarose et une goutte de bromure d'éthyldium (BET). Le gel, après solidification, est inondé par une solution de TBE à 0,5M jusqu'à recouvrement total des puits. Les puits sont ensuite remplis par 5µl de milieu PCR et 1 µl de bleu de bromophénol 6M. Trois puits supplémentaires sont utilisés : le premier reçoit un smart ladder (différents fragments d'ADN), le deuxième un témoin positif (fragment d'ADN à 1500 pdb) et le troisième un témoin négatif (milieu PCR sans ADN). La migration se fait sous une tension de 100 volts pendant 37 min, dans un appareil « Embi Tec RunoneTM electrophoresis cell ». Les fragments d'ADN sont visibles aux UV à 300 nm grâce aux BET qui s'insèrent entre les plateaux de bases de l'ADN. Le gel est enfin photographié sur une table UV «Pharmacia Biotech. Imager Master® VDS », la position des bandes d'ADN 16S par rapport aux bandes du smart ladder nous confirme la taille d'ADN.

Le séquençage des produits de la PCR nécessite une étape de purification éliminant les impuretés consécutives aux réactions antérieures. Dans ce but, l'électrophorèse est refaite avec 45µl de milieu PCR, après migration, les bandes d'ADN sont retirées sous UV avec des lames stériles et sont placées dans des tubes eppendorff pour subir ensuite d'autres tours d'électrophorèse en parallèle avec le smart ladder.

2-3- Séquençage

La technique de séquençage est réalisée selon la méthode de Sanger (**Sanger *et al.*, 1977**), en utilisant les amorces 1387R. L'analyse des réactions de séquences est effectuée automatiquement par le séquenceur d'ADN « GATC Biotech AG, Germany ». Les séquences sont enfin corrigées en utilisant le logiciel « Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes) ».

2-4- Analyse des séquences

Les séquences des gènes des ARNr 16S obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie de séquence en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans GenBank.

Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011), selon la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987). Le niveau de confiance de topologie des arbres phylogénétiques ont été estimés par la méthode des analyses de rééchantillonnage des données avec 1000 réplifications.

Résultats et discussion

1- Souche S1

1-1- Macromorphologie et caractères cultureux

Les différentes observations concernant la croissance, le développement du mycélium aérien et la pigmentation de la souche S1 sont rassemblées dans le **tableau 3**. Elle a une bonne croissance sur les milieux ISP4, ISP6, ISP7 et Amidon-caséine en développant un mycélium aérien abondant. Sur tous les autres milieux, la souche présente un mycélium aérien moins important. Sa pigmentation sur les milieux de l'ISP tend vers une couleur crème, beige ou jaune marron, colorations retrouvées sur l'ensemble des milieux (**Figure 11**). Ceci permet de classer cette souche dans la série jaune (Pridham, 1965). La coloration du mycélium de substrat varie suivant les milieux, elle est grise sur les milieux ISP4 et Amidon-caséine ou beige à jaune marron sur les autres milieux. La présence d'un pigment diffusible dont la teinte varie du jaune marron au marron a été mise en évidence. Ce pigment est sensible aux variations de pH : il vire au jaune en milieu acide et au rose en milieu basique.

1-2- Étude de la micromorphologie

Les observations microscopiques du mycélium aérien de la souche S1 mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés. Les chaînes de spores portées à l'extrémité des hyphes sont droites de type rectiflexible (RF) pouvant porter jusqu'à 40 spores par chaîne. Les spores sont cylindriques et ne présentent aucune mobilité. Le mycélium de substrat quant à lui est long, très arborescent, non fragmenté et ne portant pas de spores (**Figure 12**).

Tableau 3. Caractéristiques culturelles de la souche S1.

Temps de culture	Milieu de culture	Caractéristique de la croissance	Pigmentation	
			Mycélium végétatif	Mycélium aérien
7 ^{ème} jour	ISP2	Moyenne	Jaune marron foncé	Jaune marron (+pigment diffusible*)
	ISP3	Moyenne	Crème	Crème brillant
	ISP4	Bonne	Gris foncé	Crème opaque poudreux
	ISP5	Faible	Jaune crème	Jaune crème (+pigment diffusible*)
	ISP6	Bonne	Beige	Beige
	ISP7	Bonne	Jaune marron clair	Jaune marron clair
	Glucose asparagine	Moyenne	Jaune marron	Jaune marron
	Amidon caséine	Bonne	Gris foncé verdâtre	Crème poudreux
	Hickey et Tresner	Moyenne	Rose pale	Beige
	14 ^{ème} jour	ISP2	Moyenne	Marron
ISP3		Moyenne	Crème	Crème brillant
ISP4		Bonne	Gris verdâtre	Crème grisâtre poudreux
ISP5		Faible	Jaune marron clair	Jaune marron (+pigment diffusible*)
ISP6		Bonne	Beige	Beige
ISP7		Bonne	marron	Marron (+pigment diffusible*)
Glucose asparagine		Moyenne	Jaune orange	Jaune orange
Amidon caséine		Bonne	Gris verdâtre	Crème poudreux
Hickey et Tresner		Moyenne	Beige	Beige
21 ^{ème} jour		ISP2	Moyenne	Marron
	ISP3	Moyenne	Crème	Crème brillant
	ISP4	Bonne	Gris verdâtre	Crème grisâtre poudreux
	ISP5	Faible	Jaune marron clair	Jaune marron (+pigment diffusible*)
	ISP6	Bonne	Beige	Beige
	ISP7	Bonne	marron	Marron (+pigment diffusible*)
	Glucose asparagine	Moyenne	Jaune orange	Jaune orange
	Amidon caséine	Bonne	Gris verdâtre	Crème poudreux
	Hickey et Tresner	Moyenne	Beige	Beige

(*) Le pigment diffusible vire au jaune en milieu acide et au rose en milieu basique

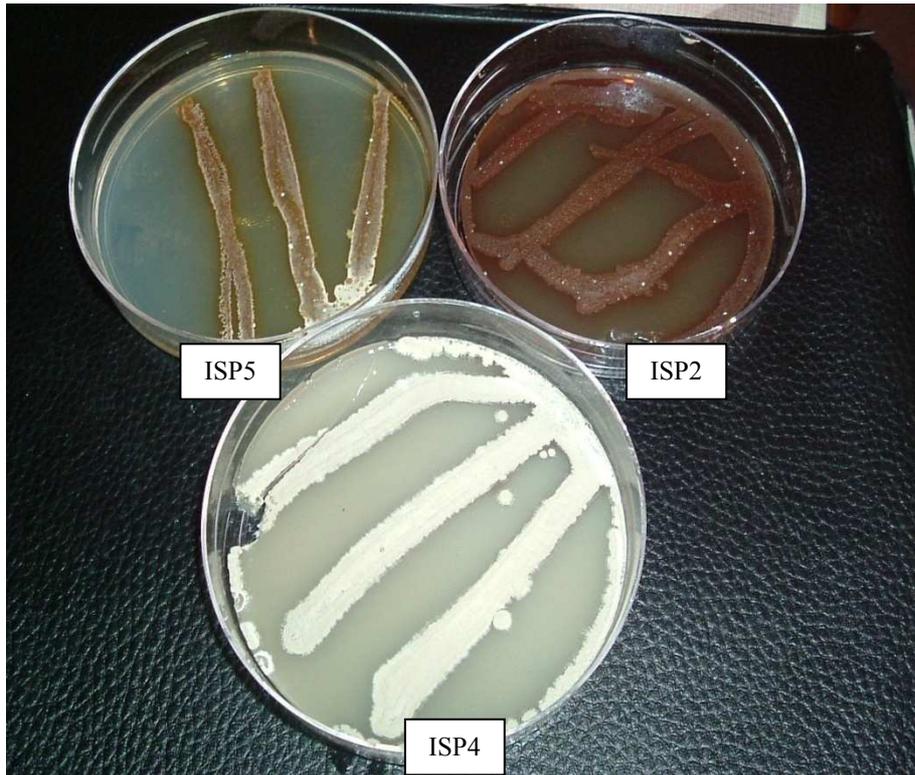


Figure 11. Culture de la souche S1 sur milieux ISP2, ISP4 et ISP5.

Il est important de signaler l'importance de l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude de la morphologie puisque l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation complète) (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Ainsi, on a remarqué que seul le milieu ISP4 (permettant une bonne croissance de la souche) a permis une meilleure observation du mycélium aérien et de la forme des spores alors que celle du mycélium végétatif apparaît sur l'ensemble des milieux.

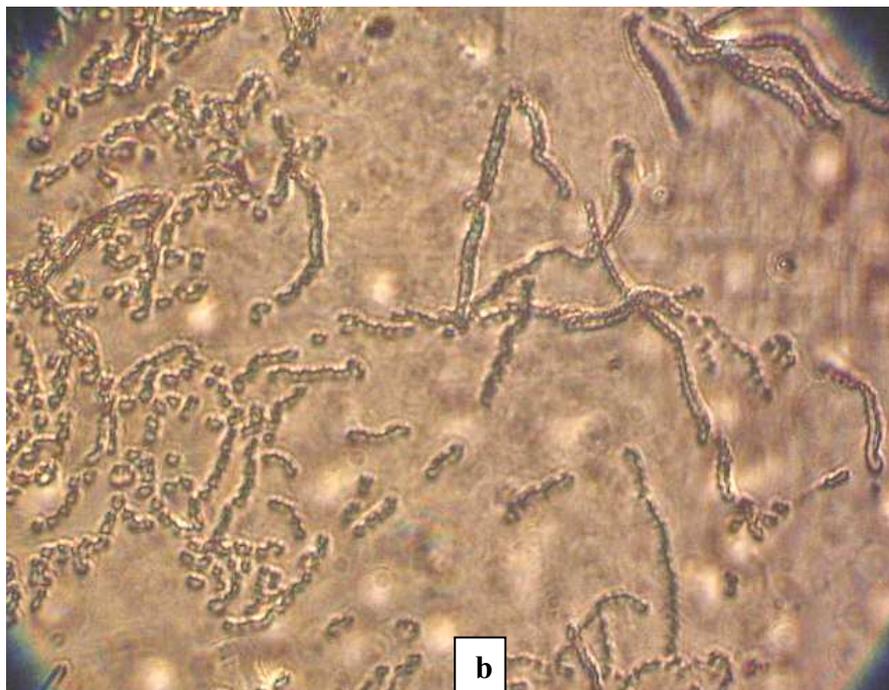


Figure 12. Observation microscopique de la souche S1 (grossissement X100):
a- Mycélium de substrat b- Mycélium aérien.

1-3- Étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques

La souche S1 assimile tous les substrats carbonés à l'exception du rhamnose, saccharose et raffinose (**Tableau 4**). Les autres caractéristiques physiologiques et biochimiques de la souche sont rassemblées dans le **tableau 5**. La bactérie produit un pigment mélanoidé sur ISP7. Elle hydrolyse l'amidon, la gélatine (**Figure 13**) et la caséine, péptonise le lait (**Figure 14**), tolère jusqu'à 7% de NaCl, réduit les nitrates en nitrites et ne produit pas d'H₂S. Elle croît bien à des températures comprises entre 22°C et 37°C avec une température optimale de 28°C (avec 50 mg de poids sec) et un pH optimum de 6,5. Pour les autres caractères, la souche S1 a montré des réactions négatives à l'exception de la production d'uréase et la présence de lysine décarboxylase.

Tableau 4. Utilisation des différentes sources de carbone par la souche S1.

Source de carbone	Utilisation
D-glucose	+
L-rhamnose	-
D-mannitol	+
Mannose	+
D-xylose	+
Dextrine	+
D-galactose	+
Saccharose	-
L-arabinose	+
D-fructose	+
Maltose	+
Lactose	+
Raffinose	-
i-inositol	+
Cellulose	+

(+) : utilisation du sucre, (-) : non utilisation du sucre.

Tableau 5. Autres caractères physiologiques et biochimiques de la souche S1.

Tests	Résultats
Production de pigments mélanoides sur: Milieu ISP 6 Milieu ISP 7	- ⁽¹⁾ +
Hydrolyse de : Amidon Gélatine Caséine	+ + +
Action sur le lait écrémé Peptonisation Coagulation	+ -
Réduction des nitrates	+
Tolérance au Na Cl	7 %
Croissance à différentes températures : 4°C 22°C 28°C 37°C 45°C	(Poids secs/40ml) - + (22,45mg) + (50mg) + (35mg) -
Croissance à différents pH : 5,5 6 6,5 7 7,5 8	+ ⁽²⁾ ++ +++ ++ ++ ++
Utilisation du citrate comme seule source de carbone	-
Production de H ₂ S	-
Production d'indole	-
Présence de la tryptophane désaminase	-
Présence de décarboxylase : Arginine Lysine Ornithine	- + -
Présence d'uréase	+

⁽¹⁾ Pour les tests :

- (+) : croissance de la souche ou réaction positive du test
 (-) : la souche ne croit pas ou réaction négative du test

⁽²⁾ Pour la croissance à différents pH

- (+++): croissance abondante
 (++) : croissance moyenne
 (+) : croissance faible



Figure 13. Hydrolyse de la gélatine par la souche S1.

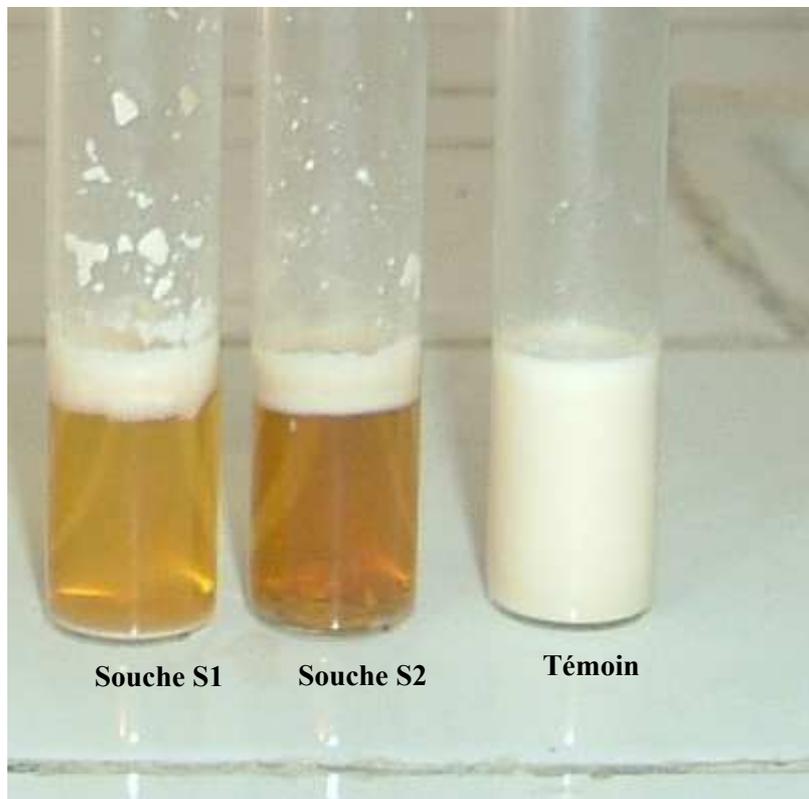


Figure 14. Action des souches étudiées sur le lait écrémé.

1-4- Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S

Après l'électrophorèse des produits de la PCR des gènes de l'ARNr 16S de la souche S1, le gel d'agarose-TBE est photographié sur table UV, les bandes d'ADN ont migré dans la région 1500 paires de bases (**Figure 15**).

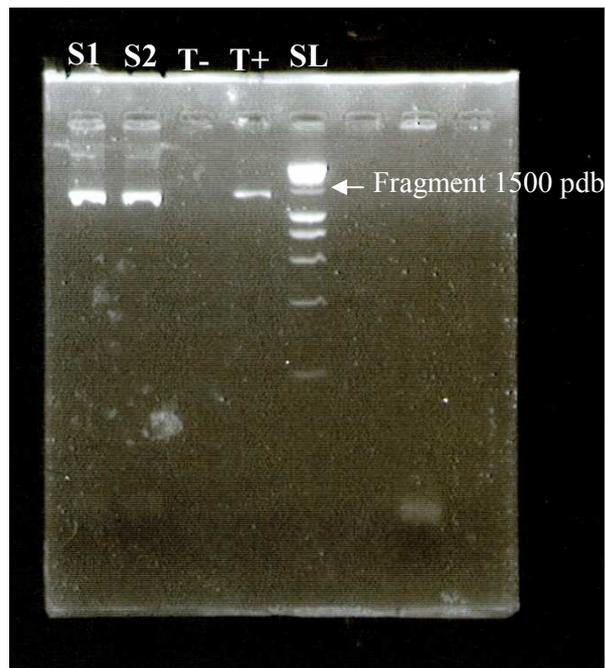


Figure 15. Résultats de l'électrophorèse des produits de la PCR des souches S1 et S2 (T+: témoin positif, T-: témoin négatif, SL : smart ladder).

La séquence des gènes de l'ARN ribosomal 16S de la souche S1 obtenue a été comparée à celles d'autres organismes de la base de données GenBank. Les analyses de similitude (BLAST) effectuées confirment son appartenance au genre *Streptomyces* et la rapprochent à seulement huit espèces connues et répertoriées (**tableau 6**).

Tableau 6. Espèces proches de la souche S1 et leurs degrés de similitude selon les résultats du BLAST.

Espèces proches	Degrés de similitude (%)*	Numéro d'accèsion*
<i>Streptomyces flaveus</i> NBRC 12345	99,92	AB184082
<i>Streptomyces scabiei</i> NBRC 12914	99,92	AB301482
<i>Streptomyces anulatus</i> NBRC 13369	99,92	AB184875
<i>Streptomyces olivaceus</i> NBRC 3152	99,92	AB184736
<i>Streptomyces tricolor</i> NBRC 15457	99,92	AB184683
<i>Streptomyces cavourensis subsp. washingtonensis</i> NBRC 15391	99,92	AB184642
<i>Streptomyces praecox</i> NBRC 13073	99,92	AB184293
<i>Streptomyces chrysomallus</i> NBRC 12755	99,92	NR041062

* : Résultats de BLAST

Un arbre phylogénétique a été construit par la méthode des distances Neighbor-Joining (**Figure 16**), c'est une méthode de distance basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences les plus voisines qui minimise la somme des longueurs des branches de chaque étape de regroupement, à l'aide du logiciel MEGA version 5 et en utilisant le test de « bootstrap » (nombre sur les branches) de 1000 réplifications, c'est-à-dire rééchantillonnage des données 1000 fois ce qui donne enfin le pourcentage obtenus et qui est mentionné au niveau des nœuds de l'arbre.

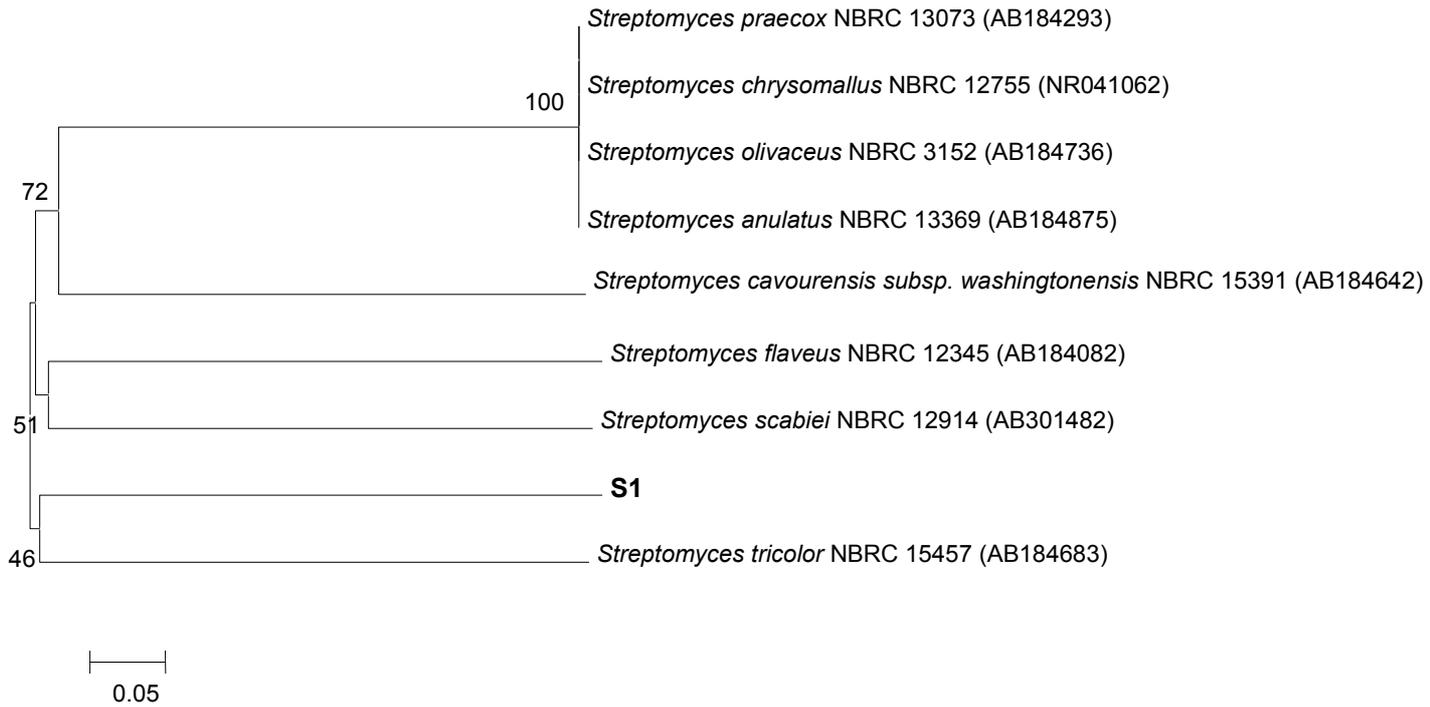


Figure 16. Arbre phylogénétique basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S1 (logiciel MEGA 5).

- la barre représente 5 substitutions par 100 nucléotides.
- les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap.
- les numéros d'accèsion dans la base de données GenBank sont reportés en face de chaque souche.

Selon cet arbre la souche S1 semble être apparentée à *Streptomyces tricolor* NBRC15457 car elle occupe la même ligne phylogénétique que cette espèce avec un pourcentage de bootstrap faible (46%), en effet, plus le pourcentage de bootstrap de deux souches est élevé plus la probabilité qu'elles appartiennent à la même espèce est élevée. Selon la nouvelle classification de **Labeda et al. (2012)**, les souches de *Streptomyces* dont le pourcentage de bootstrap est inférieur à 60% sont classées dans des groupes différents, en plus la distance génétique entre les séquences des gènes des deux espèces, indiquée dans la matrice de distance (déterminée par le même logiciel) est de 0,74 (**Tableau 7**), cette valeur reste la plus faible en comparaison avec les distances entre la souche S1 et les autres souches *Streptomyces* proches.

La souche S1 est donc très proche de *Streptomyces tricolor* NBRC15457 occupant la même ligne phylogénétique avec un haut degré de similitude (99,92%), mais les constats cités ci-dessus (pourcentage de bootstrap faible, distance génétique assez importante) n'inclut pas nécessairement la souche S1 dans cette espèce.

Tableau 7. Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S (logiciel MEGA5).

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]
[1]								
[2]	0.75							
[3]	0.75	0.73						
[4]	0.75	0.73	0.74					
[5]	0.75	0.73	0.74	0.00				
[6]	0.74	0.76	0.75	0.73	0.73			
[7]	0.77	0.75	0.72	0.70	0.70	0.72		
[8]	0.75	0.73	0.74	0.00	0.00	0.73	0.70	
[9]	0.75	0.73	0.74	0.00	0.00	0.73	0.70	0.00

[1] Souche S1, [2] *Streptomyces flaveus* NBRC 12345, [3] *Streptomyces scabiei* NBRC 12914, [4] *Streptomyces anulatus* NBRC 13369, [5] *Streptomyces olivaceus* NBRC 3152, [6] *Streptomyces tricolor* NBRC 15457, [7] *Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis* NBRC 15391, [8] *Streptomyces praecox* NBRC 13073, [9] *Streptomyces chrysomallus* NBRC 12755

Suite à des études moléculaires, **Lanoot et al. (2004)** ont considéré *Streptomyces tricolor* comme synonyme de *Streptomyces roseodiasticus* alors qu'elles étaient deux espèces distincts dans la dernière édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. La dernière classification de **Labeda et al. (2012)** considère les deux souches comme deux espèces appartenant au groupe 116 avec *Streptomyces bangladeshensis* AAB-4^T et *Streptomyces rameus* NBRC 15453^T dont le pourcentage de bootstrap est de 99%. Toutes ces données supposent qu'il s'agit probablement de la même espèce ou d'espèces très proches (puisque *S. bangladeshensis* présente des caractères morphologiques différents des trois autres). Ainsi, pour préciser l'appartenance à une espèce donnée de notre souche, il est nécessaire de procéder à l'identification polyphasique avec les autres espèces du groupe 116, c'est-à-dire la combinaison de techniques moléculaires avec les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques. Le **tableau 8** rapporte les caractères classiques des quatre souches à comparer, il apparaît clairement que la souche S1 possède des caractères morphologiques différents des autres souches à l'exception de *S. bangladeshensis* qui est la plus proche de notre souche avec une couleur jaune et une forme rectiflexible du mycélium aérien, cependant, des différences sont observées au niveau de l'assimilation du rhamnose, du saccharose, du lactose et du raffinose ainsi que la production d'H₂S et les autres caractères physiologiques.

La souche S1 ne ressemble donc à aucune espèce citée dans le groupe 116 y compris *S. tricolor* (la plus proche au niveau de l'arbre phylogénétique) et *S. bangladeshensis* (la plus proche au niveau des caractères phénotypiques), ce qui nous laisse dire qu'il s'agit probablement **d'une nouvelle espèce**. En effet, l'origine de la souche S1 (isolée de Sebkhah d'Ezzmoul) laisse supposer que les espèces adaptées à ce milieu extrême sont éventuellement particulières. Cependant, pour confirmer notre hypothèse il faut faire appel à une autre technique, utilisée dans de nombreuses études sur les *Streptomyces* et qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux souches. C'est l'hybridation ADN-ADN, Pour **Stackebrandt et Goebel (1994)**, lorsqu'il existe moins de 97% de similarité entre les séquences des ARNr 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 97, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN. C'est une méthode qui a montré dans certains cas une bonne corrélation avec l'identification basée sur la morphologie et la physiologie.

Tableau 8. Comparaison des caractères phénotypiques de la souche S1 avec les espèces proches du groupe 116.

Caractères phénotypiques	Souche S1	<i>Streptomyces tricolor</i> (Williams <i>et al.</i> , 1989)	<i>Streptomyces roseodiastaticus</i> (Williams <i>et al.</i> , 1989)	<i>Streptomyces rameus</i> (Williams <i>et al.</i> , 1989)	<i>Streptomyces bangladeshensis</i> (Albari <i>et al.</i> , 2005)
Morphologie :					
Couleur du MA	Crème, jaune à jaune marron	Gris	Gris	Gris	Jaune
Couleur du MS	Jaune à gris verdâtre (vire au rose en milieu basique)	Jaune, rouge ou bleu	nd	nd	Beige
PD	Jaune marron à marron (vire au rose en milieu basique)	Bleu	Pas de PM	Pas de PM	Jaune. Pas de PM
TCS	RF	S	S	S	RF
NSC	40	nd	nd	nd	8 à 10
FS	cylindrique	nd	nd	nd	nd
Utilisation de :					
D-glucose	+	nd	+	+	+
L-rhamnose	-	nd	+	-	+
D-mannitol	+	nd	nd	+	+
Mannose	+	nd	nd	nd	+
D-xylose	+	nd	+	+	+/-
Dextrine	+	nd	nd	nd	nd
D-galactose	+	nd	nd	+	+
Saccharose	-	nd	nd	+	+
L-arabinose	+	nd	+	+	+
D-fructose	+	nd	nd	+	+
Maltose	+	nd	nd	nd	+
Lactose	+	nd	nd	nd	-
Raffinose	-	nd	nd	+	+
i-inositol	+	nd	nd	-	+
Cellulose	+	nd	nd	nd	nd
Autres propriétés :					
Production de H₂S	-	nd	nd	nd	+
Température de croissance	28°C	nd	nd	nd	20°C à 50°C
Tolérance NaCl	7%	nd	nd	nd	2%

MA : mycélium aérien, MS : mycélium de substrat, PD : pigment diffusible, PM : pigment mélanoidé,
TCS : type de chaîne de spores, NSC : nombre de spores par chaîne, FS : forme de spore, RF :
rectiflexible, S : spirale, nd : non déterminé, + : utilisation, - : non utilisation.

2- Souche S2

2-1- Macromorphologie et caractères cultureux

La souche S2 présente une très bonne croissance sur l'ensemble des milieux testés à l'exception du milieu ISP5 (**Tableau 9**). Ce microorganisme sera classé dans la série grise compte tenue de la prédominance de cette couleur au niveau du mycélium aérien, c'est seulement le milieu ISP5 qui donne une couleur blanche grisâtre de ce mycélium (**Figure 17**). Le dos de la colonie (mycélium végétatif) varie du blanc, gris rose au gris. Ce pigment est intracellulaire mais diffuse à l'extérieur sur les milieux ISP2, ISP7, Amidon caséine et Hickey et Tresner et est insensible aux variations de pH.

Tableau 9. Caractéristiques culturelles de la souche S2

Temps de culture	Milieu de culture	Caractéristique de la croissance	Pigmentation	
			Mycélium végétatif	Mycélium aérien
7 ^{ème} jour	ISP2	Bonne	Gris rose	Gris (milieu devient foncé)
	ISP3	Bonne	Gris foncé	Gris
	ISP4	Bonne	Gris	Gris
	ISP5	Moyenne	Rose très pale	Blanc
	ISP6	Bonne	Blanc sale	Gris très clair
	ISP7	Bonne	Beige marron	Gris (milieu devient marron)
	Glucose asparagine	Moyenne	Rouge pale	Gris très clair
	Amidon caséine	Bonne	Blanc	Gris (milieu devient foncé)
	Hickey et Tresner	Bonne	Gris rose foncé	Gris (+pigment diffusible*)
14 ^{ème} jour	ISP2	Bonne	Gris rose	Gris (milieu foncé)
	ISP3	Bonne	Gris foncé	Gris
	ISP4	Bonne	Gris	Gris
	ISP5	Moyenne	Rose pale	Blanc grisâtre
	ISP6	Bonne	Blanc sale	Gris très clair
	ISP7	Bonne	Beige	Gris et centre blanc (milieu marron)
	Glucose asparagine	Bonne	Blanc grisâtre	Gris clair
	Amidon caséine	Bonne	Blanc	Gris (milieu foncé)
	Hickey et Tresner	Bonne	Gris rose foncé	Gris foncé (+pigment diffusible*)
21 ^{ème} jour	ISP2	Bonne	Gris rose	Gris (milieu foncé)
	ISP3	Bonne	Gris foncé	Gris
	ISP4	Bonne	Gris	Gris
	ISP5	Moyenne	Rose pale	Blanc grisâtre
	ISP6	Bonne	Blanc sale	Gris très clair
	ISP7	Bonne	Beige	Gris et centre blanc (milieu marron)
	Glucose asparagine	Bonne	Blanc grisâtre	Gris clair
	Amidon caséine	Bonne	Blanc	Gris (milieu foncé)
	Hickey et Tresner	Bonne	Gris rose foncé	Gris foncé (+pigment diffusible*)

(*) Le pigment diffusible est insensible aux variations de pH

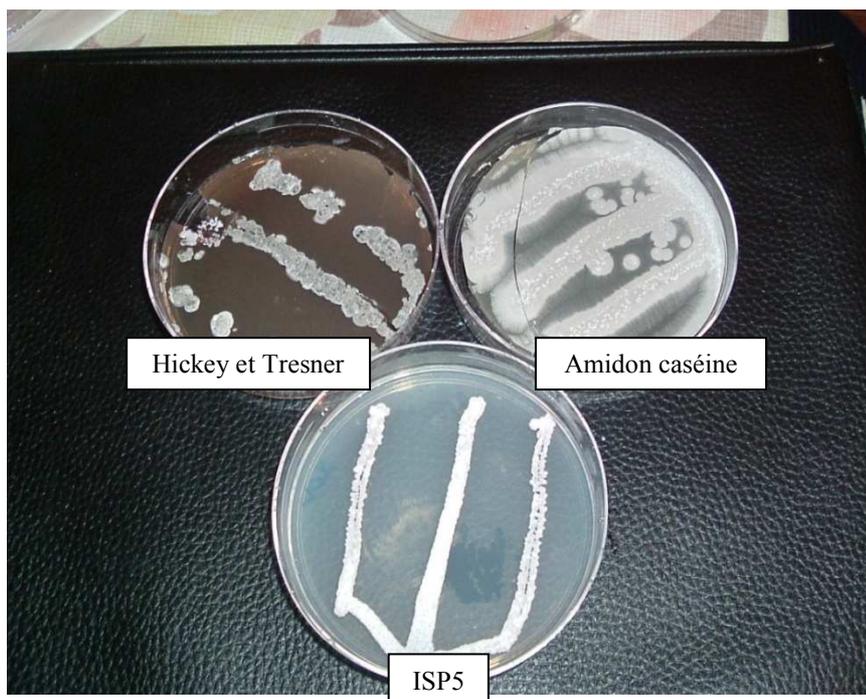


Figure 17. Culture de la souche S2 sur milieux Amidon caséine, Hickey et Tresner et ISP5.

2-2- Étude de la micromorphologie

Comme tous les *Streptomyces*, la souche S2 présente une structure mycélienne (**Figure 18**). Le mycélium végétatif apparaît sous forme d'un réseau très ramifié d'hyphes non fragmentés ni sporulés sur l'ensemble des milieux utilisés. Il supporte un mycélium secondaire abondant et bien sporulé. Les chaînes de spores de type rectiflexible RF portent des spores en forme cylindrique dont le nombre qui varie d'un milieu de culture à un autre, peut atteindre 40 spores par chaîne (**Figure 19**).

2-3- Étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques

La souche S2 assimile préférentiellement le glucose, le mannose, la xylose, les dextrines, le galactose, l'arabinose, le maltose et le lactose (**Tableau 10**). Elle produit un pigment mélanoidé sur ISP7, dégrade l'amidon, la gélatine, la caséine, peptonise le lait (**Figure 14**), réduit les nitrates en nitrites et tolère jusqu'à 3% de NaCl. Concernant les autres caractères, la souche S2 n'utilise pas le citrate, ne produit ni d'H₂S ni d'indole ni tryptophane désaminase mais possède l'uréase et l'arginine décarboxylase. Elle ne se développe pas aux températures extrêmes (4°C et 45°C) et présente une croissance optimale à 37°C à un pH de 6 à 6,5 (**Tableau 11**).



Figure 18. Bord de la colonie de la souche S2 sous microscope photonique (Grossissement X 10).

Tableau 10. Utilisation des différentes sources de carbone par la souche S2.

Source de carbone	Utilisation
Témoin négatif	-
D-glucose	+
L-rhamnose	-
D-mannitol	-
Mannose	+
D-xylose	+
Dextrine	+
D-galactose	+
Saccharose	-
L-arabinose	+
D-fructose	-
Maltose	+
Lactose	+
Raffinose	-
i-inositol	-
Cellulose	-

(+) : utilisation du sucre, (-) : non utilisation du sucre

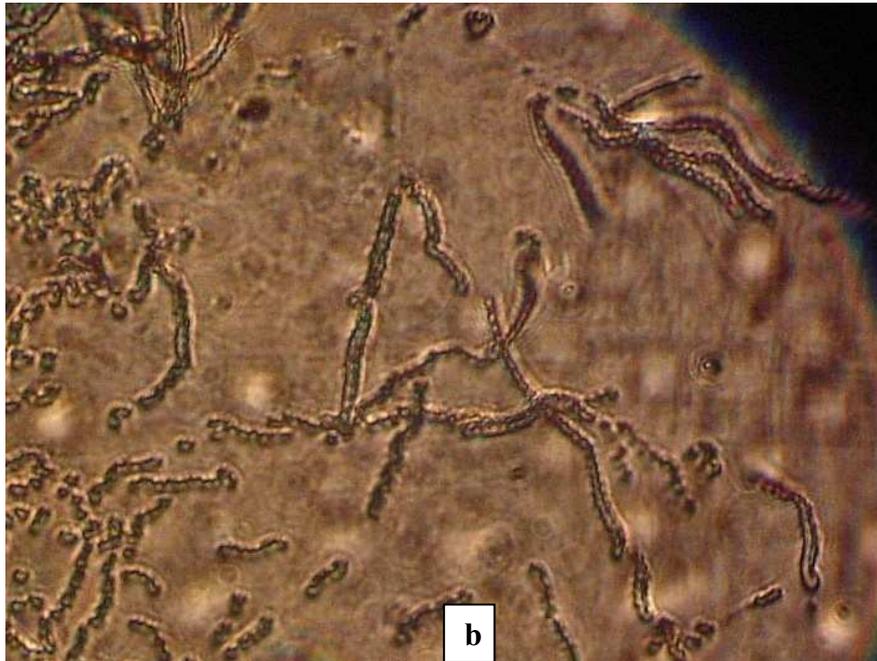
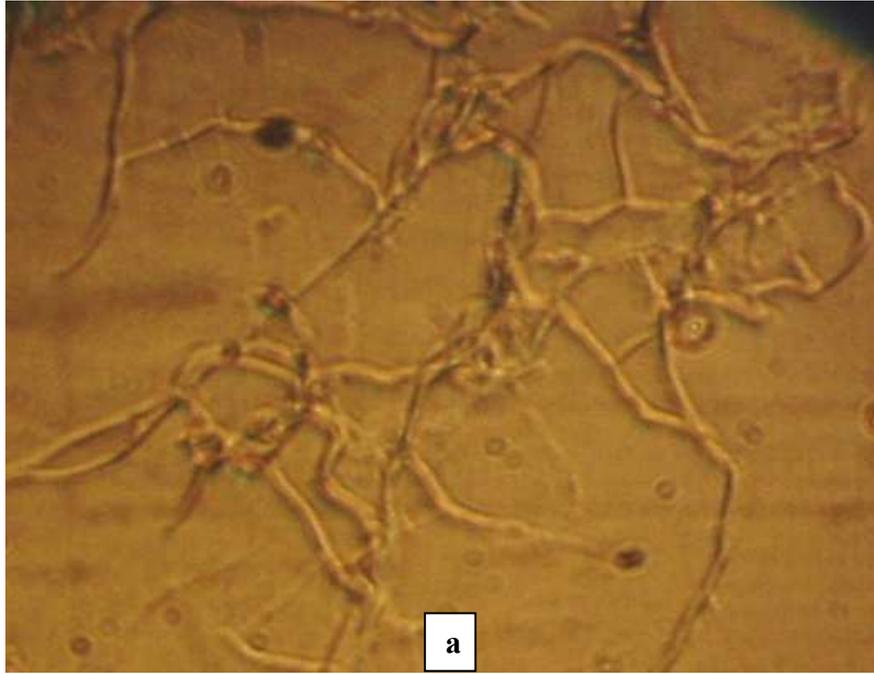


Figure 19. Observation microscopique de la souche S2 (grossissement X100):
a- Mycélium de substrat b- Mycélium aérien.

Tableau 11. Autres caractères physiologiques et biochimiques de la souche S2.

Tests	Résultats
Production de pigments mélanoides sur: Milieu ISP 6 Milieu ISP 7	 - ⁽¹⁾ +
Hydrolyse de : Amidon Gélatine Caséine	 + + +
Action sur le lait écrémé Peptonisation Coagulation	 + -
Réduction des nitrates	+
Tolérance au Na Cl	3 %
Croissance à différentes températures : 4°C 22°C 28°C 37°C 45°C	(Poids secs/40ml) - + (27,2 mg) + (42,7 mg) + (155mg) -
Croissance à différents pH : 5,5 6 6,5 7 7,5 8	 + ⁽²⁾ +++ +++ ++ ++ +
Utilisation du citrate comme seule source de carbone	-
Production de H ₂ S	-
Production d'indole	-
Présence de la tryptophane désaminase	-
Présence de décarboxylase : Arginine Lysine Ornithine	 + - -
Présence d'uréase	+

⁽¹⁾Pour les tests :

- (+) croissance de la souche ou réaction positive du test
- (-) : la souche ne croit pas ou réaction négative du test

⁽²⁾Pour la croissance à différents pH

- (+++): croissance abondante
- (++): croissance moyenne
- (+): croissance faible

2-4- Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S

Les produits de la PCR des gènes de l'ARNr 16S de la souche S2, ont migré en électrophorèse sur gel d'agarose-TBE dans la région 1500 paires de bases comme le montre la **figure 15**.

Après comparaison des séquences des gènes de l'ARN ribosomal 16S de la souche S2 à celles d'autres organismes de la base de données GenBank, les analyses de similitude (BLAST) effectuées ont permis de la rapprocher à 24 espèces connues et répertoriées réunies dans le **tableau 12**.

L'arbre phylogénétique construit par la méthode des distances Neighbor-Joining (logiciel MEGA version 5) est représenté dans la **figure 20**, en utilisant toujours le test de « bootstrap » de 1000 réplifications. *Streptomyces roseolus* NBRC 12816^T est l'espèce la plus proche de la souche S2 occupant la même ligne phylogénétique avec un haut degré de similitude (98,97%), un pourcentage de bootstrap de 30% et une distance génétique de 0,74 (**Tableau 13**), ces deux dernières observations supposent qu'il s'agit probablement de deux espèces différentes malgré le haut degré de similitude. Il faut donc faire appel aux caractères phénotypiques pour trancher.

Streptomyces roseolus NBRC 12816^T = ATCC 23210 a été décrite la première fois par (**Preobrazhenskaya et Sveshnikova, 1957**) dont les différents caractères phénotypiques ont été détaillés par (**Shirling et Gottlieb, 1968a**). Selon la nouvelle classification phylogénétique de **Labeda et al., (2012)**, elle est classée dans le groupe 43 dont le pourcentage de bootstrap est de 100% avec *Streptomyces roseosporus* CGMCC 4.1871^T, toutes les deux appartiennent à la classe 5 de la taxonomie numérique phénotypique de **Williams et al., (1983a)**. Elles ont été considérées comme synonyme dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (**Williams et al., 1989**).

Tableau 12. Espèces proches de la souche S2 et leurs degrés de similitude selon les résultats du BLAST.

Espèces proches	Degrés de similitude (%)*	Numéro d'accèsion*
<i>Streptomyces violaceorectus</i> NBRC 13102 ^T	99,44	NR041114
<i>Streptomyces globisporus subsp. globisporus</i> NRRL B-2293	99,68	DQ026634
<i>Streptomyces cinereoruber subsp. cinereoruber</i> NBRC 12756	99,92	AB184121
<i>Streptomyces showdoensis</i> ISP 5504	99,44	AY999741
<i>Streptomyces showdoensis</i> NBRC 13417 ^T	99,44	NR041129
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> NRRL B-5333	99,44	EU594479
<i>Streptomyces termitum</i> NRRL B-3804	99,44	EF178672
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> NBRC 13511	99,05	AB184443
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> NRRL B-3559	99,44	EU594478
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> NBRC 3105	99,44	AB184726
<i>Streptomyces hirsutus</i> NRRL B-2713	99,37	NR043819
<i>Streptomyces viridobrunneus</i> NBRC 15902	99,37	AB184714
<i>Streptomyces castaneus</i> NBRC 13670	99,29	AB184453
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> IFO 12912 ^T	99,28	AY999864
<i>Streptomyces bikiniensis</i> NBRC 14598	99,21	AB184602
<i>Streptomyces tanashiensis subsp. cephalomyceticus</i> NBRC 13929	99,21	AB184549
<i>Streptomyces nashvillensis</i> NBRC 13064 ^T	99,12	NR041106
<i>Streptomyces roseoviolascens</i> NBRC 14277	99,12	AB184587
<i>Streptomyces filamentosus</i> NBRC 12910	98,97	AB184238
<i>Streptomyces roseolus</i> NBRC 12816 ^T	98,97	NR041076
<i>Streptomyces bikiniensis</i> DSM 40581 ^T	98,97	NR026177
<i>Streptomyces gardneri</i> NBRC 12865 ^T	98,89	AB249908
<i>Streptomyces narbonensis</i> NBRC 12801	98,89	AB184157
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> NRRL S-1546 ^T	99,05	DQ442538

(*): Résultats de BLAST, (^T): Souche type.

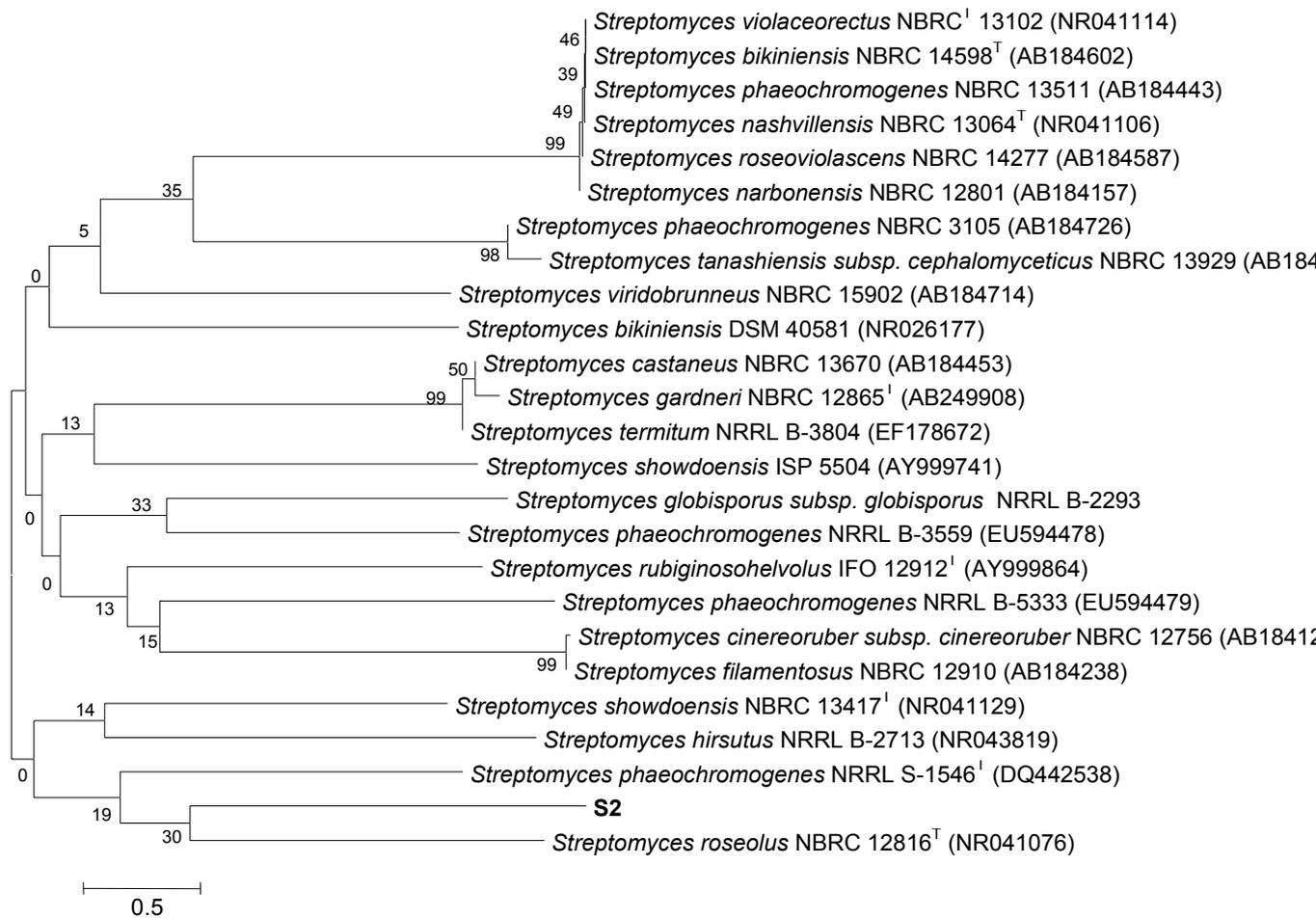


Figure 20. Arbre phylogénétique basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S2 (Logiciel MEGA 5).

-la barre représente 5 substitutions par 10 nucléotides.

-les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap.

-les numéros d'accèsion dans la base de données GenBank sont reportés en face de chaque souche.

Tableau 13. Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S (logiciel MEGA5).

[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]		
[1]																										
[2]	0.76																									
[3]	0.76	0.73																								
[4]	0.75	0.77	0.75																							
[5]	0.77	0.74	0.74	0.75																						
[6]	0.74	0.74	0.74	0.76	0.75																					
[7]	0.76	0.74	0.74	0.72	0.73	0.72																				
[8]	0.75	0.72	0.74	0.76	0.72	0.73	0.74																			
[9]	0.76	0.00	0.73	0.77	0.74	0.74	0.74	0.72																		
[10]	0.76	0.74	0.71	0.74	0.73	0.74	0.73	0.74	0.74																	
[11]	0.74	0.69	0.74	0.72	0.76	0.74	0.73	0.76	0.69	0.74																
[12]	0.77	0.76	0.74	0.74	0.73	0.73	0.75	0.73	0.76	0.78	0.75															
[13]	0.76	0.74	0.75	0.74	0.75	0.72	0.72	0.72	0.74	0.74	0.73	0.75														
[14]	0.75	0.73	0.74	0.76	0.72	0.73	0.74	0.01	0.72	0.74	0.75	0.73	0.72													
[15]	0.75	0.73	0.75	0.75	0.73	0.75	0.74	0.74	0.73	0.72	0.73	0.74	0.72	0.74												
[16]	0.76	0.00	0.73	0.77	0.74	0.74	0.74	0.72	0.00	0.74	0.69	0.76	0.74	0.72	0.73											
[17]	0.75	0.72	0.74	0.73	0.76	0.74	0.73	0.76	0.72	0.74	0.04	0.75	0.73	0.76	0.73	0.72										
[18]	0.76	0.01	0.73	0.77	0.74	0.74	0.74	0.72	0.01	0.74	0.69	0.76	0.74	0.73	0.73	0.01	0.72									
[19]	0.76	0.01	0.73	0.77	0.74	0.74	0.74	0.73	0.01	0.74	0.69	0.76	0.74	0.73	0.72	0.01	0.72	0.01								
[20]	0.75	0.77	0.75	0.01	0.75	0.76	0.73	0.76	0.77	0.75	0.72	0.74	0.74	0.76	0.75	0.77	0.73	0.77	0.77							
[21]	0.74	0.76	0.72	0.73	0.73	0.76	0.77	0.73	0.76	0.73	0.73	0.74	0.75	0.74	0.73	0.76	0.72	0.76	0.76	0.73						
[22]	0.74	0.74	0.74	0.75	0.74	0.73	0.74	0.74	0.73	0.71	0.74	0.73	0.73	0.74	0.75	0.74	0.73	0.74	0.73	0.75	0.75					
[23]	0.75	0.73	0.74	0.76	0.72	0.73	0.74	0.01	0.73	0.74	0.75	0.74	0.73	0.01	0.74	0.73	0.76	0.73	0.73	0.76	0.74	0.74				
[24]	0.76	0.01	0.73	0.77	0.75	0.74	0.74	0.72	0.01	0.74	0.69	0.76	0.74	0.72	0.73	0.01	0.73	0.01	0.02	0.77	0.76	0.73	0.72			
[25]	0.73	0.76	0.75	0.73	0.74	0.74	0.72	0.77	0.76	0.75	0.75	0.74	0.73	0.77	0.75	0.76	0.75	0.75	0.75	0.73	0.74	0.74	0.76	0.76		

[1] Souche S2, [2] *Streptomyces violaceorectus* NBRC 13102, [3] *Streptomyces globisporus subsp. globisporus* NRRLB-2293, [4] *Streptomyces cinereoruber subsp. cinereoruber* NBRC 12756 , [5] *Streptomyces showdoensis* ISP5504, [6] *Streptomyces showdoensis* NBRC 13417, [7] *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL B-5333, [8] *Streptomyces termitum* NRRL B-3804 , [9] *Streptomyces phaeochromogenes* NBRC 13511, [10] *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL B-3559 , [11] *Streptomyces phaeochromogenes* NBRC3105, [12] *Streptomyces hirsutus* NRRL B-2713, [13] *Streptomyces viridobrunneus* NBRC 1590, [14] *Streptomyces castaneus* NBRC 13670 , [15] *Streptomyces rubiginosohelvolus* IFO 12912, [16] *Streptomyces bikiniensis* NBRC 14598, [17] *Streptomyces tanashiensis subsp. cephalomyceticus* NBRC 13929, [18] *Streptomyces nashvillensis* NBRC13064, [19] *Streptomyces roseoviolascens* NBRC 14277, [20] *Streptomyces filamentosus* NBRC 12910, [21] *Streptomyces roseolus* NBRC 12816, [22] *Streptomyces bikiniensis* DSM40581, [23] *Streptomyces gardneri* NBRC 12865, [24] *Streptomyces narbonensis* NBRC 12801, [25] *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL S-1546^T .

La souche S2 possède le même type de chaîne de spores (rectiflexible) que les

deux espèces (*Streptomyces roseolus*, *Streptomyces roseosporus*) mais les couleurs du mycélium aérien et du mycélium de substrat ainsi que les différents pigments sont totalement différents (Tableau 14). Aussi, la souche S2 diffère des deux espèces répertoriées au niveau de l'assimilation du rhamnose. Ces constatations sont corroborées par la valeur de bootstrap faible et la distance génétique importante entre la souche S2 et *Streptomyces roseolus*. On peut enfin conclure que cette souche isolée d'un milieu très peu exploité, correspond probablement à une nouvelle espèce. Néanmoins, il faut employer la méthode d'hybridation ADN-ADN avec les espèces proches, pour confirmer notre supposition.

Tableau 14. Comparaison des caractères phénotypiques de la souche S2 avec les espèces proches du groupe 43.

Caractères phénotypiques	Souche S2	<i>Streptomyces roseolus</i> (Shirling et Gottlieb, 1968a)	<i>Streptomyces roseosporus</i> (Shirling et Gottlieb, 1968b)
Morphologie :			
Couleur du MA	Gris clair à gris foncé	Rouge à jaune	Rouge, jaune ou blanc
Couleur du MS	Beige à gris rose foncé	Sans pigment	Jaune grisâtre à marron jaunâtre
PD	Marron- Présence PM	Absence- Pas de PM	Absence- Pas de PM
TCS	RF	RF	RF
NSC	40	10 à 50	Plus de 50
FS	cyllindrique	cyllindrique	cyllindrique
Utilisation de :			
D-glucose	+	+	+
L-rhamnose	-	+	+
D-mannitol	-	-	-
Mannose	+	nd	nd
D-xylose	+	+	+
Dextrine	+	nd	nd
D-galactose	+	nd	nd
Saccharose	-	-	nd
L-arabinose	+	+	+
D-fructose	-	+/-	+/-
Maltose	+	nd	nd
Lactose	+	nd	nd
Raffinose	-	-	-
i-inositol	-	-	-
Cellulose	-	nd	nd

MA : mycélium aérien, MS : mycélium de substrat, PD : pigment diffusible, PM : pigment mélanoidé, TCS : type de chaîne de spores, NSC : nombre de spores par chaîne, FS : forme de spore, RF : rectiflexible, S : spirale, nd : non déterminé, + : utilisation, - : non utilisation.

Mise en évidence des activités antimicrobiennes des souches S1 et S2

Les actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces* sont connus comme étant de grands producteurs d'antibiotiques et un des objectifs de notre étude est de rechercher de nouvelles molécules antibiotiques. Ainsi, les stratégies de recherche de nouveaux antibiotiques passent, en premier lieu, par la mise en évidence des différentes activités sur milieu solide. Ceci constitue un criblage primaire.

Pour **mettre en évidence** les activités antimicrobiennes des deux souches identifiées et essayer de **cerner leur spectre d'activité**, il est nécessaire de les cultiver sur différents milieux de culture pour streptomycètes puis les mettre en présence des divers microorganismes-tests en faisant appel, en cas de besoin, à plus d'une technique.

Matériel et méthodes

1- Activité antibactérienne

1-1- Préparation des inocula de bactéries-tests

Pour chaque souche, un inoculum est réalisé à partir d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive. À partir de cette culture, une suspension, d'absorbance de 0,20 à 0,25 à 650 nm est préparée dans de l'eau physiologique. Une dilution 1/10 de cette suspension sert d'ensemencer une gélose molle Mueller-Hinton en surfusion.

L'activité antibactérienne a été testée contre des bactéries suivantes :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible aux antibiotiques),
- *Streptococcus faecalis* ATCC 19433 (sensible aux antibiotiques),
- *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible aux antibiotiques),
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (sensible aux antibiotiques),

- *Bacillus cereus* résistant aux β -lactamines et aux sulfamides, (CHU de Constantine)
- *Streptococcus faecalis* résistant à la pénicilline, à la tétracycline et au cotrimoxazole, (CHU de Constantine),
- *Staphylococcus aureus mu50* résistant à la vancomycine (hôpital Juntendo de Tokyo).

1-2- Mise en évidence des activités antibactériennes

1-2-1- Technique des cylindres d'Agar (Tortorano *et al.*, 1979)

Les souches de *Streptomyces* sont ensemencées en stries serrées à la surface de 15 ml de milieux AF, Bennett, GBA, SC et milieu synthétique. Après 14 jours d'incubation à 28°C, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont prélevés et sont déposés à la surface des milieux ensemencés avec les bactéries-tests. Placés deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives, les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les bactéries-tests sont ensemencés dans la masse dans 5ml du milieu Mueller-Hinton faiblement gélosé. Cette suspension est étalée sur une couche du même milieu gélosé.

1-2-2- Technique de la double couche

Cette technique voisine de celle utilisée par **Peterson (1954)**, a été utilisée comme complément de la première. Les souches de *Streptomyces* sont ensemencées en touches sur la bordure des boîtes de Pétri contenant les deux milieux sélectionnés par le premier test, après 14 jours d'incubation à 28°C. Cette culture est recouverte par 15 ml du Mueller-Hinton faiblement gélosé et préalablement ensemencé en masse avec une bactérie-cible. Après incubation à 37°C, les zones d'inhibition (distance entre le bord de la colonie d'actinomycètes et la limite de la zone où la bactérie-cible n'est pas inhibée) sont mesurées en mm.

2- Activité antifongique

2-1- Préparation des inocula de germes cibles

2-1-1- Inoculum levurien

Des tubes contenant le milieu Sabouraud sont ensemencés à partir d'une culture en pente du même milieu. Après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C, la culture est diluée afin d'obtenir une absorbance comprise entre 0,15 et 0,20 à 650 nm. Cet inoculum est dilué au 1/10^e au moment de son utilisation. L'activité antilevurienne a été recherchée contre *Candida albicans* (souche multisensible, récupérée auprès du CHU de Constantine).

2-1-2- Inoculum fongique

Les champignons filamenteux sont repiqués sur milieu à l'extrait de malt et incubés à 28°C pendant 14 à 21 jours. Une suspension dense de spores et de fragments mycéliens est obtenue par raclage des cultures après addition d'eau physiologique. La suspension est diluée jusqu'à atteindre une absorbance de 0,20 à 650 nm. Cette suspension diluée au 1/10^e servira d'inoculum calibré.

L'activité antifongique a été recherchée contre les mycètes sensibles suivants :

-*Aspergillus niger* CIP 1431

-*Aspergillus fumigatus* CIP 108274

-*Fusarium oxysporium* CIP 62572

2-2- Mise en évidence des activités antifongiques

La production de métabolites antifongiques par les souches *Streptomyces* est mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar en utilisant le milieu Sabouraud pour les levures et le milieu à l'extrait de malt pour les champignons. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures pour les levures et à 28°C pendant 3 jours pour les champignons filamenteux.

3- Étude statistique (Analyse de la variance (ANOVA) à trois facteurs)

L'analyse statistique par analyse de la variance (méthode ANOVA) réalisé par le logiciel « Statistica 7 », est employée pour l'évaluation des effets des trois facteurs (souche productrice, milieu et souche-test) ainsi que les interactions sur l'apparition de l'activité antimicrobienne.

4- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes

La cinétique de production de substances antimicrobiennes par les deux souches de *Streptomyces* a été suivie sur les milieux solides AF et Bennett en utilisant la technique des cylindres d'Agar. Un cylindre est prélevé quotidiennement du premier au quatorzième jour d'incubation puis testé contre les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (sensibles) et contre *Aspergillus fumigatus* pour la souche S1 et *Candida albicans* pour la souche S2.

Résultats et discussions

1- Activité antibactérienne

1-1- Technique des cylindres d'Agar

Les souches S1 et S2 montrent des activités antibactériennes contre toutes les souches sensibles et résistantes testées (**Figures 21 et 22**) avec des diamètres d'inhibition de la souche S1 plus importants que ceux de la souche S2 (**Figures 23 et 24**). Ce qui suppose une meilleure activité par rapport à la souche S2. En effet, une forte concentration de molécules bioactives libérées diffuse plus rapidement que la croissance de la souche-test ce qui conduit à une zone d'inhibition importante (**Koch, 1999**). L'activité contre les bactéries à Gram positif apparaît plus importante en comparaison avec celle contre les bactéries à Gram négatif, essentiellement dans le cas de l'activité contre *Pseudomonas aeruginosa* seulement présente sur milieu GBA et ceci malgré les précautions prises pour augmenter la sensibilité de la méthode. En effet, la densité de l'inoculum des souches-tests connue dans la littérature comme facteur contrôlant la sensibilité de la technique (**Iwai et Omura, 1982 ; Brooks et al., 1995 ; Madigan et**

al., 1997) a été fixée à une absorbance d'environ 0,2 à 620 nm après avoir effectué des essais faisant intervenir différentes concentrations de cellules microbiennes. Par ailleurs, la diffusion des molécules bioactives a été favorisée par l'utilisation d'un milieu faiblement gélosé et par un séjour des boîtes à +4°C pendant 2 heures avant l'incubation comme le préconisaient **Tortorano et al. (1979)**.

Les activités antibactériennes diffèrent d'un milieu de culture à un autre : les milieux AF et Bennett favorisent l'activité contre les bactéries à Gram positif alors que le milieu GBA favorise les activités anti Gram négatif. Les milieux AF et Bennett, donnent des diamètres d'inhibition importants bien qu'ils renferment des composés complexes comme l'extrait de levure et l'extrait de malt connus dans la littérature comme des substrats défavorisant la production d'antibiotiques par certaines souches de *Streptomyces spp.* (**Omura et Tanaka, 1986 ; Escalente et al., 1999**). En revanche, d'autres travaux, comme ceux de **Pandey et al. (2005)**, ont montré que l'extrait de levure est une source d'azote adéquate pour la production d'antibiotiques par les *Streptomyces*. Ces deux milieux renferment également du glucose, cette source de carbone rapidement utilisable par les bactéries inhibe généralement la production des antibiotiques lorsqu'elle est présente à des concentrations élevées dans le milieu (**Zhu et al., 2007**). Cependant, l'efficacité du milieu Bennett dans la production d'antibactériens a été prouvée par plusieurs chercheurs tels que **Awad et al. en 2009**.

La performance du milieu GBA, très utilisé dans la mise en évidence de l'activité antimicrobienne (**Shomura et al., 1979 ; Hilali et al., 2002**) s'expliquerait par la présence, d'une part, dans ce milieu d'amidon et de glycérol, qui sont considérés par plusieurs chercheurs comme des ingrédients à consommation lente augmentant la production de métabolites secondaires (**Aharonowitz , 1980 ; Volker et Altaba , 2001 ; Hasavada et al., 2006**), et d'autre part, le carbonate de calcium jouant le rôle d'agent tampon, neutralise toute acidification du milieu conduisant à une meilleure production d'antibiotique (**Tanaka , 1992**).

En ce qui concerne les germes tests, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des deux actinomycètes en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, ceci a été également constaté par **Hasavada et al. (2006)** et **Atta et al., (2009)**.

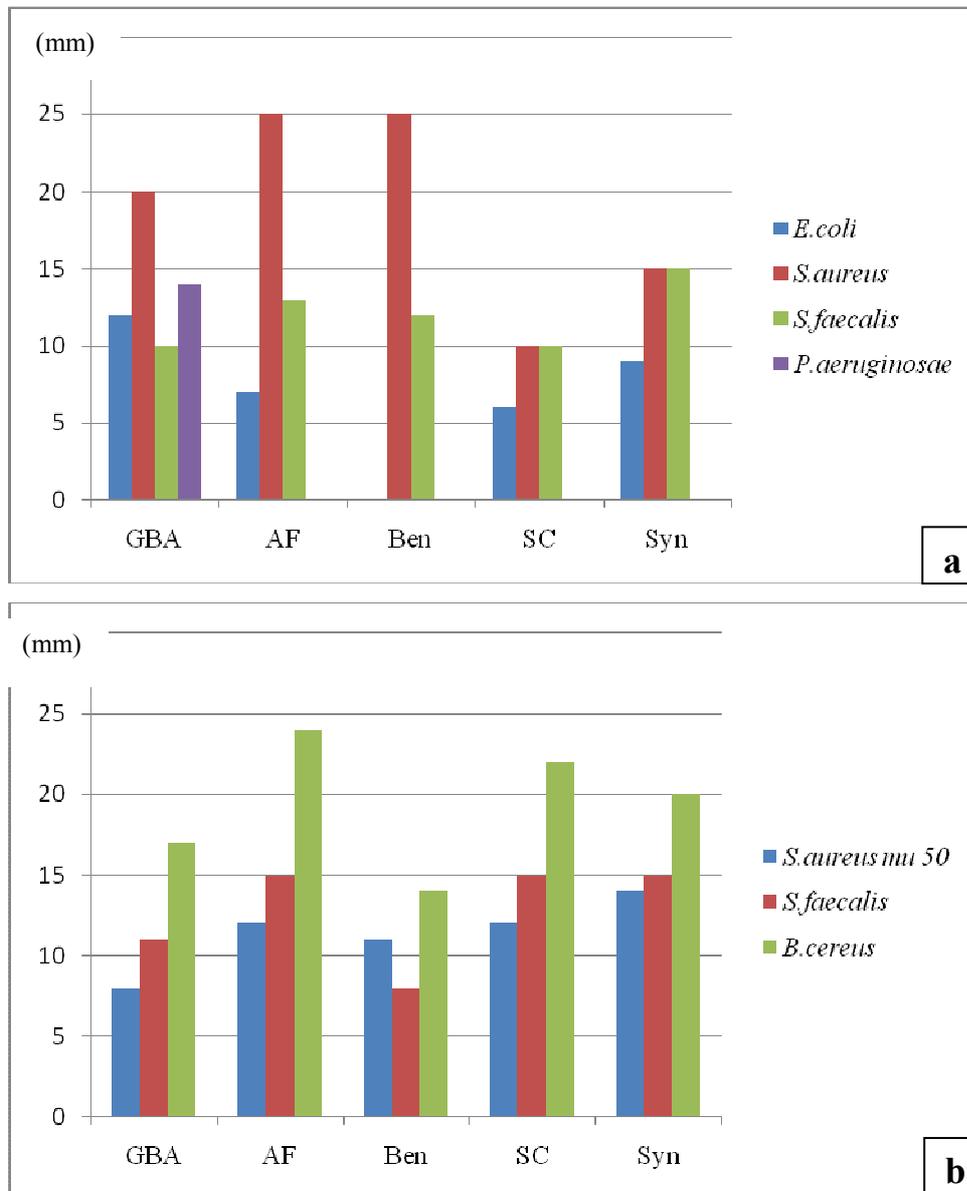


Figure 21. Activité antibactérienne de la souche S1 mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar :

-(a) : contre les germes sensibles,

-(b) : contre les germes résistants.

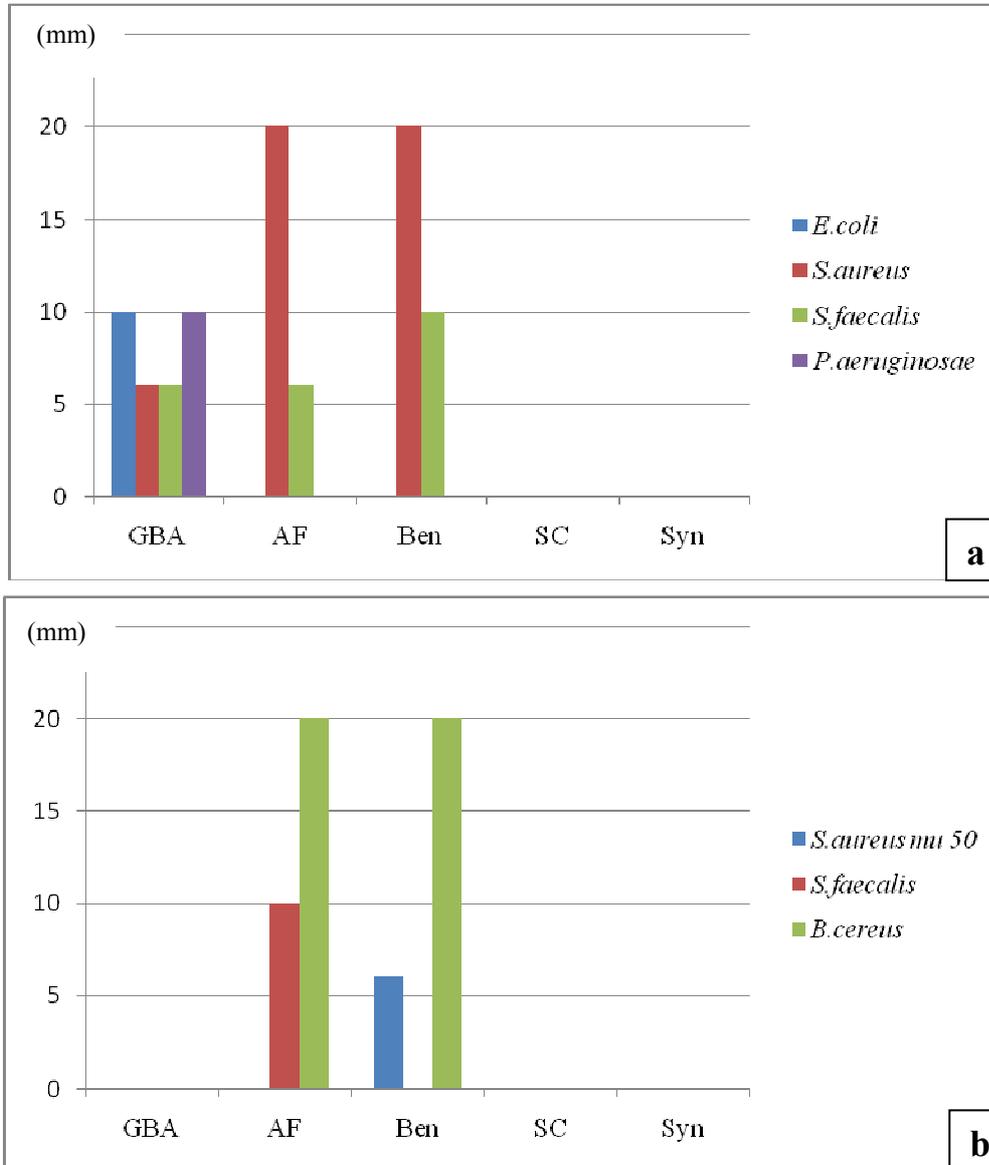


Figure 22. Activité antibactérienne de la souche S2 mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar :

-(a) : contre les germes sensibles,

-(b) : contre les germes résistants.

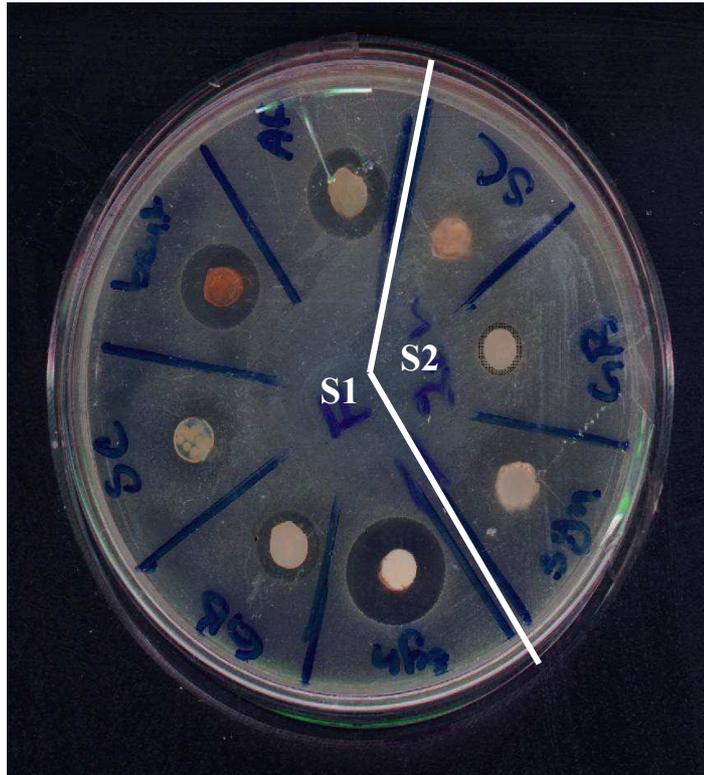


Figure 23. Test d'activité des souches S1 et S2 contre *S. faecalis* 19433 sur différents milieux de culture (technique des cylindres d'Agar).

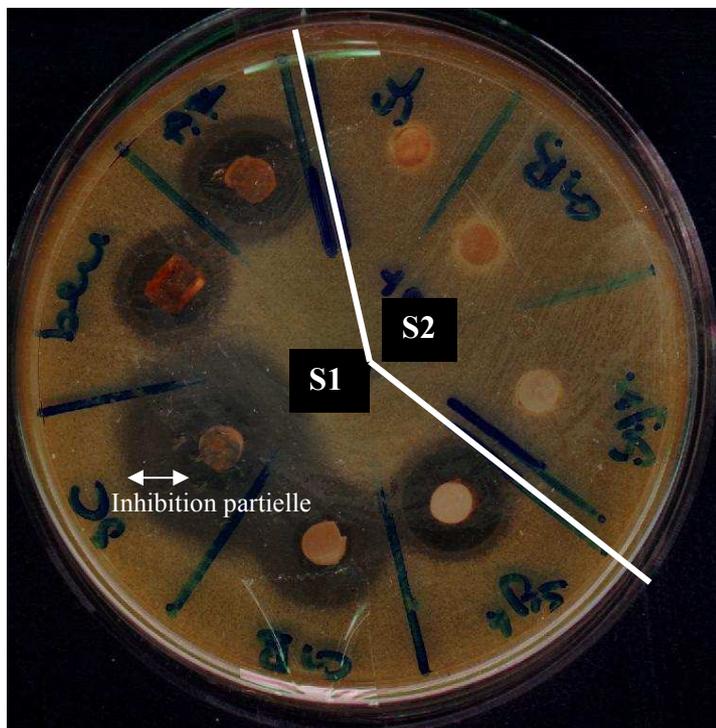


Figure 24. Test d'activité des souches S1 et S2 contre *S. aureus* Mu 50 sur différents milieux de culture (technique des cylindres d'Agar).

L'utilisation de souches bactériennes sensibles aux antibiotiques comme germes cibles, vise la détection de toutes substances antibactériennes, alors que l'utilisation de germes résistants aux β -lactamines, aux sulfamides, à la tétracycline, à la vancomycine et au cotrimoxazole, vise la recherche d'antibiotiques à structures particulières pouvant détourner le mécanisme de résistance, en effet, la recherche d'antibiotiques actifs contre des germes multirésistants constitue une des meilleures stratégies dans la découverte de nouveaux antibiotiques (Ceylan *et al.*, 2008 ; Rajan et Kannabiran, 2010).

1-2- Technique de la double couche

Les deux souches *Streptomyces* S1 et S2 ont été testées sur les deux meilleurs milieux (AF et Bennett) par la technique de la double couche (Figures 26 et 27) contre les germes sensibles aux antibiotiques dont l'une est l'espèce *P.aeruginosa* résistante à nos molécules bioactives dans le premier test. Les résultats montrent une faible activité de la souche S1 contre *P.aeruginosa* sur les deux milieux de culture (Figure 25) ce qui confirme les résultats de (Reghioua *et al.*, 2006) sur la sensibilité de la technique de la double couche par rapport à la technique des cylindres d'Agar. En ce qui concerne la souche S2, l'emploi de ce test confirme l'absence de toute activité contre les bactéries à Gram négatif sur les deux milieux AF et Bennett (Figure 25).

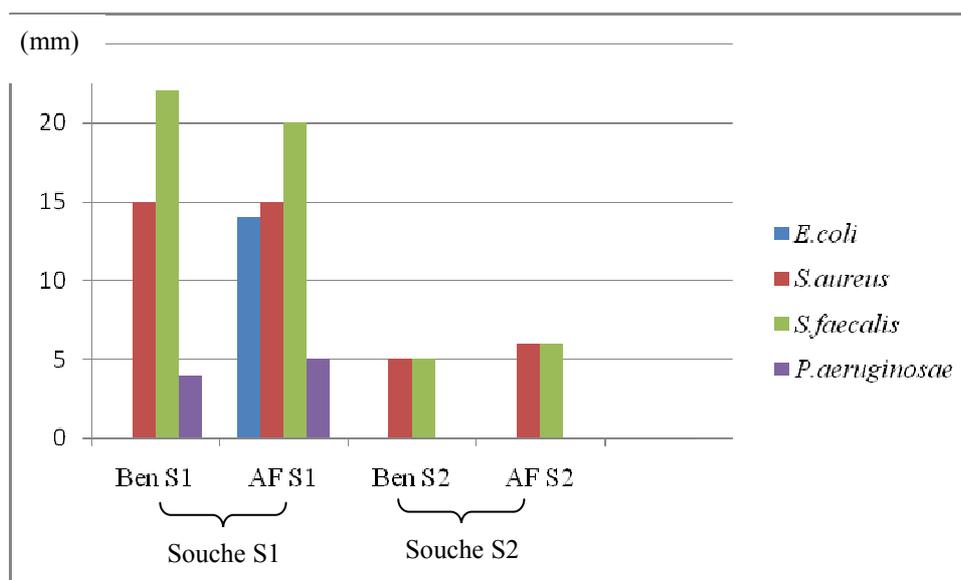


Figure 25. Activité antibactérienne des souches S1 et S2 mise en évidence par la technique de la double couche.



Figure 26. Test d'activité des souches S1 et S2 contre *S.aureus* sur milieu Bennett (technique de la double couche).

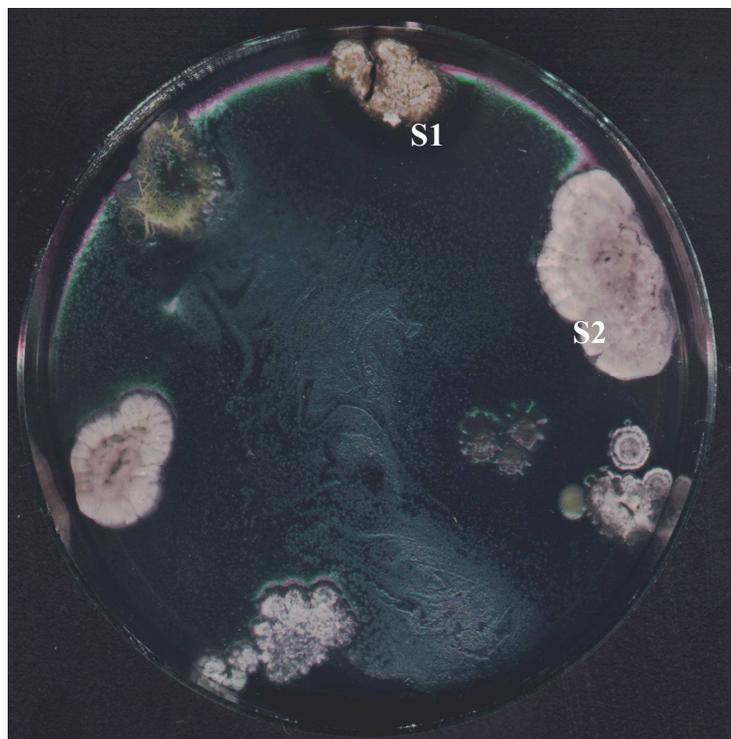


Figure 27. Test d'activité des souches S1 et S2 contre *P.aeruginosa* sur milieu Bennett (technique de la double couche).

2- Activité antifongique

La souche S1 est active contre *C. albicans*, *A. fumigatus* et *A. niger*, alors qu'aucune activité n'est détectée contre *F. oxysporium* sur l'ensemble des milieux testés (**Figure 28**), ces résultats corroborent ceux d'**Augustine et al. (2005)** montrant que les souches tests filamenteuses appartenant au genre *Aspergillus* sont les plus sensibles aux molécules bioactives d'actinomycètes.

Les milieux Bennett et SC semblent favoriser l'activité antifongique de la souche S1 alors que le milieu AF donnant une très bonne activité antibactérienne s'est montré moins efficace dans ce cas. L'efficacité du milieu Bennett dans la production d'antifongiques par rapport au milieu AF peut être attribuée à l'absence du carbonate de calcium dans ce milieu. Ainsi, l'acidification du milieu de culture au cours de la fermentation affecte la stabilité des antibactériens mais pas celle des antifongiques, sachant que la plupart des antifongiques connus sont stables à pH acide ou faiblement acide (**Holmberg, 1978**). Par ailleurs, la production d'antibactériens est plutôt favorisée par un pH alcalin du milieu de culture (**Pandey et al., 2005**). Le milieu SC est riche en sels minéraux et oligoéléments qui sont de bons ingrédients pour la synthèse d'antibiotiques par les actinomycètes (**Dumenil et Sanglier, 1989 ; Shikha et al., 2005 ; Hulya et Tarhan, 2006**), en plus de composés à consommation lente.

La souche S2 ne présente qu'une faible activité antilevurienne et une très faible activité antifongique qui apparaît seulement contre *A. fumigatus* sur milieux Bennett et AF (**Figure 29**). Ces deux milieux donnant les meilleures activités antibactériennes permettent également une production d'antifongiques mais avec des quantités plus faibles. Ces résultats confirment de nombreux travaux de recherches qui considèrent le genre *Streptomyces* comme une source importante d'antifongiques comme ceux de **Khamna et al. (2009)**.

Seul le test des cylindres d'Agar est employé pour la mise en évidence des activités antifongiques, cette technique et contrairement au test de double couche permet un ensemencement en surcouche des microorganismes-test, ce qui donne une distribution uniforme des spores fongiques sur toute la gélose, ceci est difficile à obtenir dans le cas d'un ensemencement dans la masse de moisissures.

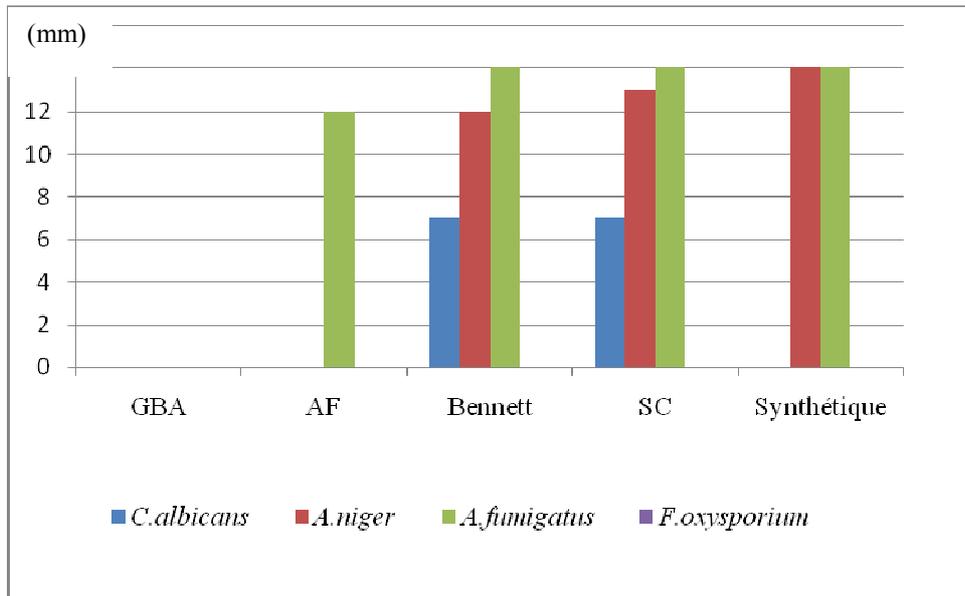


Figure 28. Activité antifongique de la souche S1 sur différents milieux de culture.

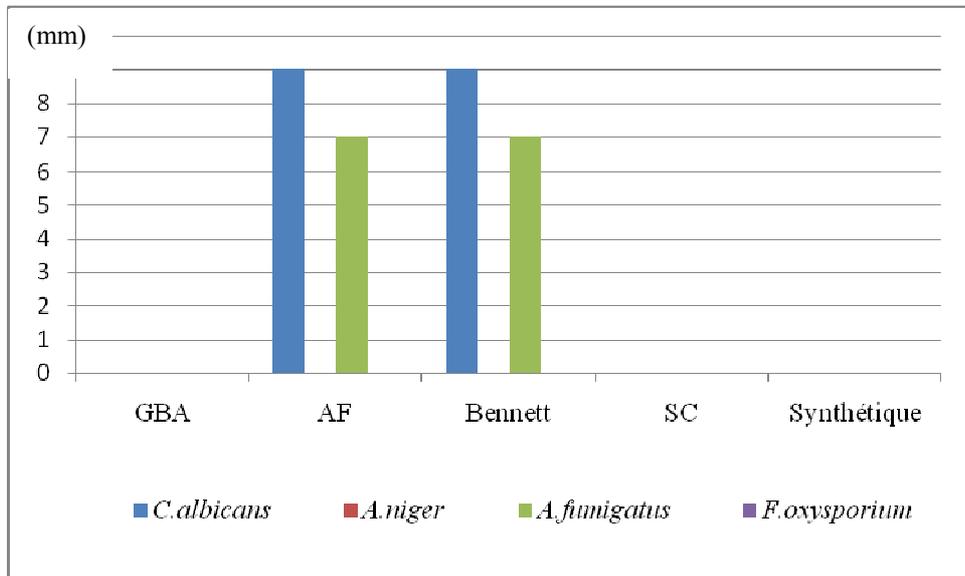


Figure 29. Activité antifongique de la souche S2 sur différents milieux de culture.

3- Étude statistique

3-1- Activité antibactérienne

L'étude statistique par analyse de la variance (méthode ANOVA) a démontré que les facteurs : souche productrice, milieu, souche-test et les interactions « souche productrice/milieu », « souche productrice/souche-test », « milieu/souche-test » et « souche productrice/milieu/souche-test » sont hautement significatifs sur l'apparition des activités antibactériennes (**Tableau 15**) ce qui confirme nos constatations faites dans la première partie sur l'influence du milieu de culture et des souches tests sur la production d'antibactériens et qui corroborent les résultats de **Tanaka (1992)** et **Brooks *et al.* (1995)**. Le milieu AF apparaît comme meilleur milieu d'activité antibactérienne pour les souches S1 et S2 contre l'ensemble des souches tests (**Figure 30**).

3-2- Activité antifongique

L'analyse de la variance a montré un effet significatif de tous les facteurs et interactions étudiés sur l'apparition de l'activité antifongique (**Tableau 16**). Cette étude a permis également de sélectionner le milieu Bennett comme meilleur milieu pour la production d'antifongiques ce qui confirme statistiquement nos observations faites dans la première partie (**Figure 31**).

Tableau 15. Analyse de la variance des effets de différents facteurs sur la production d'antibactériens (logiciel Statistica 7).

Facteur	dl	MC	F	Niveau P
1*	1	4630	5037	0.00
2*	4	242	263	0.00
3*	6	393	428	0.00
12*	4	82	90	0.00
13*	6	196	213	0.00
23*	24	100	108	0.00
123*	24	28	30	0.00

(*) Effet significatif ; Facteur 1: milieu ; Facteur 2: souche productrice ; Facteur 3: souche-test ; dl: degrés de liberté ; MC :Sommes des carrés moyens ; F: test de Fisher

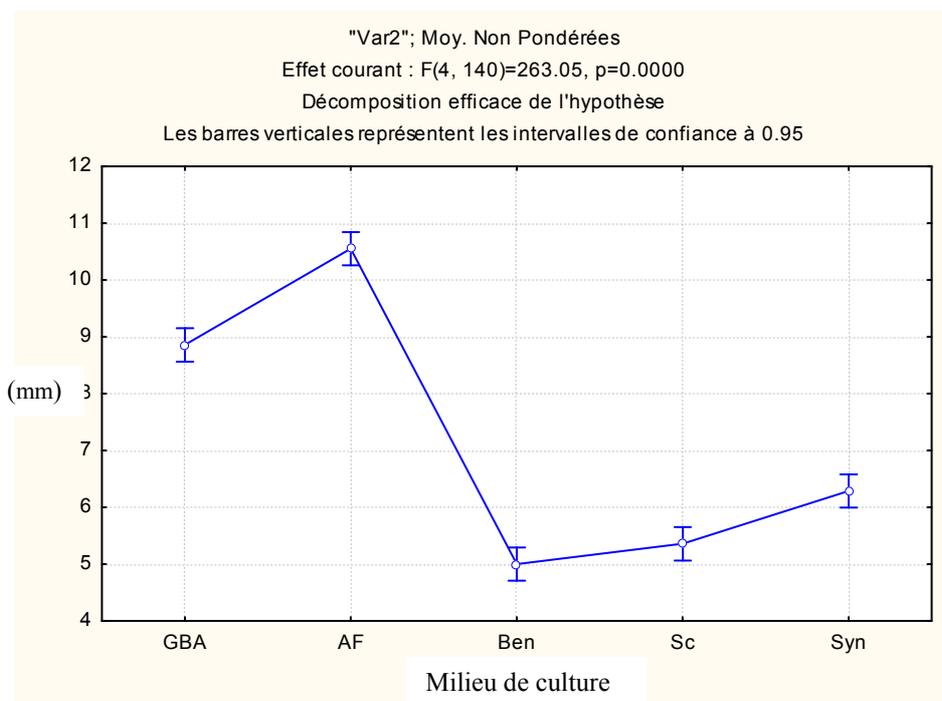


Figure 30. Effet moyen des milieux de culture sur l'ensemble des souches-tests dans la production d'antibactériens (Logiciel Statistica7).

Tableau 16. Analyse de la variance des effets de différents facteurs sur la production d'antifongiques (logiciel Statistica 7).

Facteur	dl	MC	F	Niveau P
1*	1	421.9	937.5	0.00
2*	4	118.2	262.7	0.00
3*	3	233.9	519.7	0.00
12*	4	105.0	233.3	0.00
13*	3	173.1	384.6	0.00
23*	12	42.5	94.4	0.00
123*	12	25.2	56.0	0.00

(*) Effet significatif ; Facteur 1: milieu ; Facteur 2: souche productrice ; Facteur 3: souche-test ; dl: degrés de liberté ; MC: sommes des carrés moyens ; F: test de Fisher.

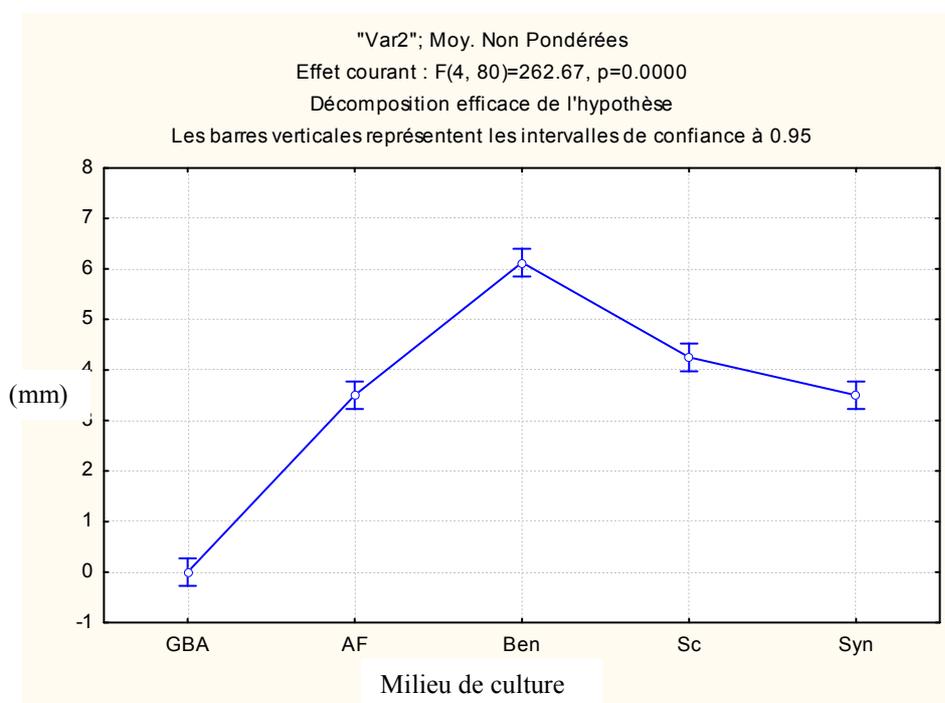


Figure 31. Effet moyen des milieux de culture sur l'ensemble des souches-tests dans la production d'antifongiques (Statistica7).

4- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes

L'activité antibactérienne de la souche S1 apparait dès le premier jour d'incubation, elle atteint son maximum au troisième jour contre *S.aureus* et au cinquième jour contre *E.coli* sur milieu AF. Alors que son activité antifongique débute, avec des valeurs importantes au cinquième jour d'incubation sur milieu Bennett et au sixième jour sur milieu AF (**Figure 32**). Ces résultats corroborent ceux de **Sejiny (1991)** qui ont montré que l'activité antibactérienne des souches *Streptomyces* spp. atteint des valeurs importantes à partir du sixième jour d'incubation.

La souche S2 a montré une importante activité antibactérienne dès le premier jour d'incubation qui augmente pour atteindre une valeur maximale au troisième jour sur les deux milieux de culture AF et Bennett (**Figure 33**). Plusieurs antibiotiques synthétisés par des souches de *Streptomyces* apparaissent au premier jour de culture selon les travaux de **Martin et Demain (1980)**, **Lohr et al. (1989)** et **Seo et al. (2010)**. Par contre, l'activité antifongique de la souche S2 ne commence qu'au cinquième jour d'incubation pour atteindre un maximum au neuvième jour.

La synthèse des molécules antibactériennes par les deux souches actinomycétales se fait très rapidement probablement parce que les cellules possèdent les enzymes et/ou les précurseurs nécessaires pour leur synthèse ou les produisent rapidement (en moins de 24 heures), alors que celle des antifongiques ne se déclenche que trois à quatre jours après l'apparition des antibactériens, c'est au cours de cette période que les actinomycètes procèdent à la synthèse d'enzymes et/ou précurseurs nécessaires (**Dumenil et Sanglier, 1989**).

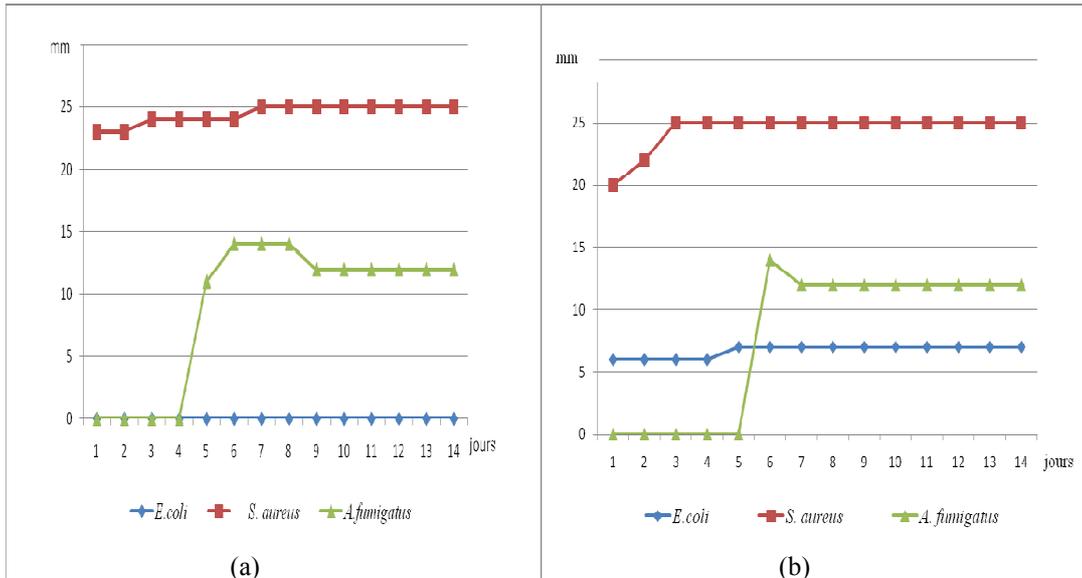


Figure 32. Cinétique de la production de substances antimicrobiennes par la souche S1:

-(a) sur milieu Bennett,

-(b) sur milieu AF.

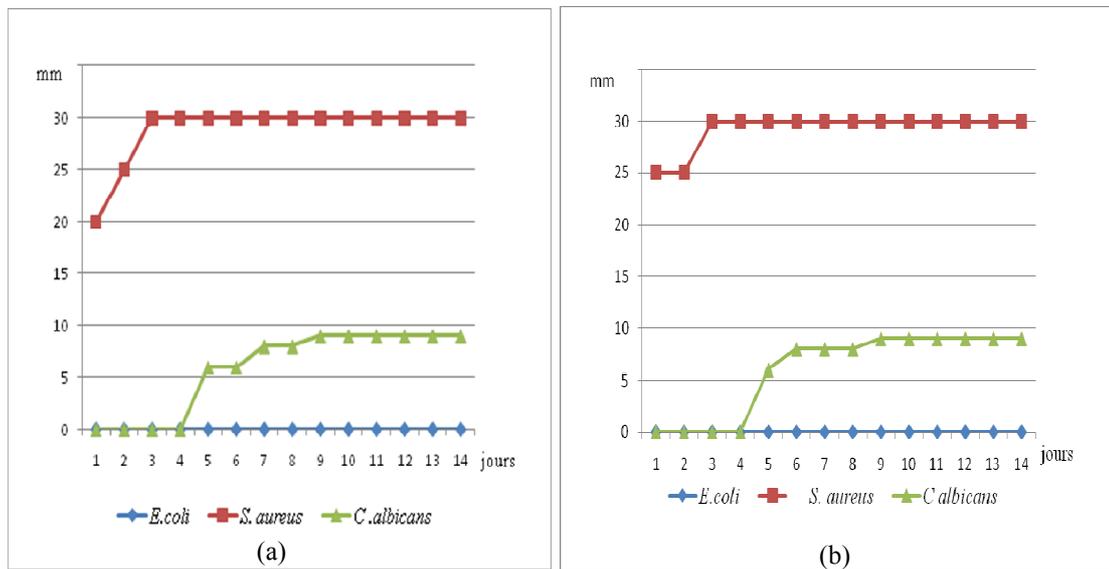


Figure 33. Cinétique de la production de substances antimicrobiennes par la souche S2:

-(a) sur milieu AF,

-(b) sur milieu Bennett.

Étude préliminaire des activités antibactériennes

Dans la troisième partie de ce travail, différentes analyses sont effectuées pour obtenir des informations sur les propriétés des molécules à activité antibactérienne des souches étudiées afin d'appréhender les problèmes posés par l'extraction et la purification de composés inconnus. Ces tests appliqués à des filtrats de fermentations, aux cultures sur milieu solide et aux extraits cellulaires des souches S1 et S2, constituent le criblage secondaire dans la stratégie de recherche de nouveaux antibiotiques. Les résultats obtenus nous permettront de choisir les méthodes appropriées pour la purification et la caractérisation des molécules bioactives produites par les deux souches.

Matériel et méthodes

1- Étude de la solubilité des substances bioactives

1-1- Extraction à partir du milieu liquide

1-1-4- Préparation des courbes d'étalonnage des souches d'actinomycètes

Des séries de dilutions décimales sont préparées à partir de suspensions de spores des deux souches étudiées. Ces suspensions sont obtenues par raclage de cultures sporulées sur milieu solide ISP4. La densité optique (DO) des différentes dilutions est mesurée au spectrophotomètre « Shimadzu UV-120-02 » à 580 nm (**Attwell et Cross, 1973**). Le comptage des spores des différentes dilutions est réalisé sur cellule de Malassez (profondeur 0,1mm, surface 0,0025 mm²). La courbe d'étalonnage comportant en ordonnées les DO et en abscisses les concentrations (spores/ml) correspondantes est enfin tracée.

1-1-2- Culture en erlenmeyers agités

Les souches d'actinomycètes sont cultivées en erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu AF. Les inocula utilisés correspondent à des suspensions contenant 10⁵ spores (**Figures 34 et 35**). Les bactéries sont cultivées à 28°C sous agitation 250 rpm pendant trois à cinq jours selon les souches, conformément aux résultats de leur cinétique de production de molécules bioactives.

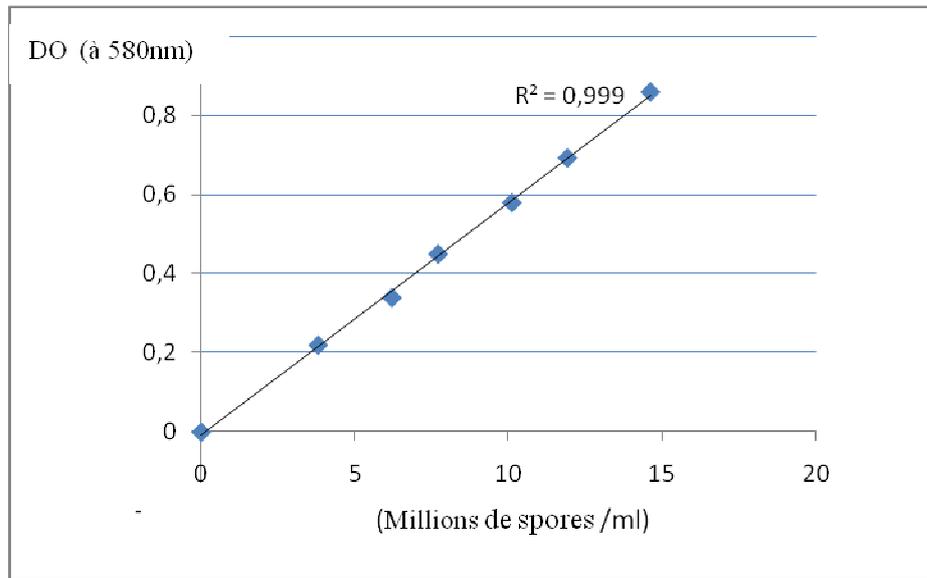


Figure 34. Courbe étalon pour le dénombrement de spores de la souche S1.

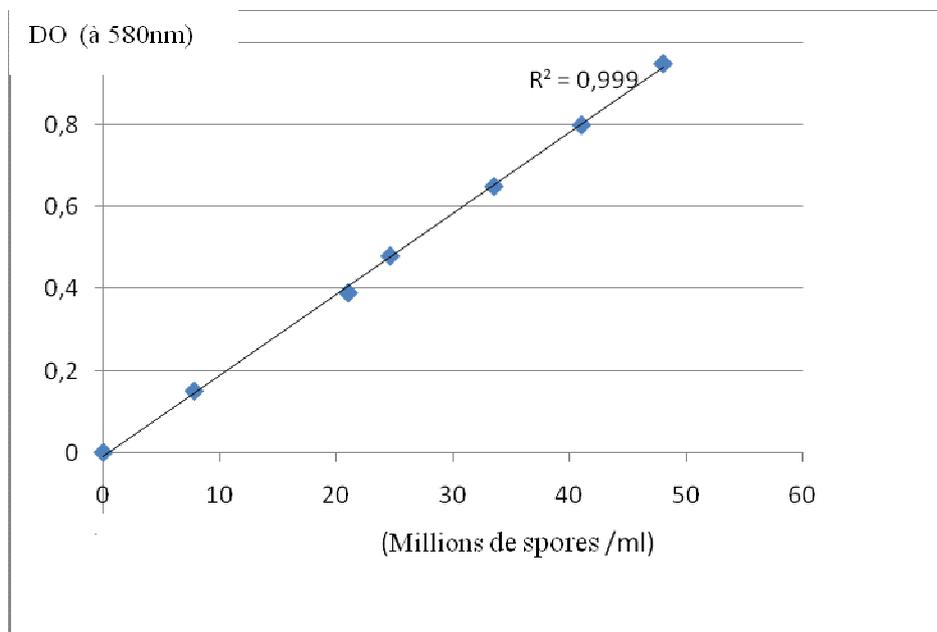


Figure 35. Courbe étalon pour le dénombrement de spores de la souche S2.

1-1-3- Préparation des extraits organiques

Toutes les cultures sont centrifugées à 11000 g pendant 20 mn dans une centrifugeuse « Sigma3k15 ». Cinq volumes du surnageant sont alors soumis à une extraction avec un volume des différents solvants : butanol, toluène ou acétate d'éthyle. Le culot (mycélium) est lavé deux fois à l'eau distillée stérile puis traité avec 5 ml de méthanol pur pendant deux heures sous agitation à +4°C. Après centrifugation à 11000 g pendant 10 mn, le surnageant méthanolique est retenu.

1-2- Extraction à partir de milieu solide

Les souches étudiées sont ensemencées en stries serrées sur milieu AF. Après incubation à 28°C pendant trois à cinq jours selon les souches, la gélose est fragmentée puis repartie dans des tubes contenant 20 ml des différents solvants : acétone, méthanol, butanol, acétate d'éthyle, toluène et hexane. Après agitation vigoureuse, les extraits organiques sont récupérés par centrifugation à 11000 g pendant 10 mn puis testés par la technique des disques.

1-3- Technique des disques (Barry *et al.*, 1970)

Les extraits organiques du surnageant et du mycélium ainsi que les extraits organiques obtenus à partir des milieux gélosés sont testés par cette technique. 500 µl sont déposés par fractions sur des disques de papier Whatman N°3 (5mm de diamètre) stériles et sont séchés sous un courant d'air froid. Les disques sont, ensuite, déposés sur gélose molle de Mueller-Hinton préalablement ensemencée avec un microorganisme-test. Des disques témoins, imprégnés de solvants purs et séchés dans les mêmes conditions, sont également testés. Les boîtes sont incubées à 37°C après une pré-diffusion de deux heures à +4°C. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 à 48 heures d'incubation.

2- Étude de la stabilité thermique des molécules bioactives

Les extraits de toluène à partir du milieu AF liquide et d'acétate d'éthyle à partir du milieu AF solide de la souche S1 et les extraits d'acétate d'éthyle et d'acétone à partir du milieu AF solide de la souche S2 sont exposés à différentes températures et à la lumière :

- à 50°C pendant 30mn,
- à 70°C pendant 30mn,

- à 100°C pendant 30mn,
- à température ambiante dans la lumière pendant trois semaines,
- à température ambiante à l'obscurité pendant trois semaines.

Les extraits traités sont testés contre *Bacillus cereus* et *Streptococcus faecalis* par la technique des disques.

3- Étude de la cinétique de l'activité antibactérienne des extraits organiques

Des cultures en milieu liquide et sur milieu solide des souches productrices sont réalisées selon le protocole décrit dans le paragraphe : Étude de la solubilité des substances bioactives. Un erlenmeyer et une boîte sont prélevés, quotidiennement, pendant les 14 jours d'incubation, l'activité antibactérienne de chaque prélèvement, après extraction par solvant organique, est recherchée contre *Bacillus cereus*.

Les différents extraits sont :

- extraits de toluène à partir du milieu AF liquide et extrait d'acétate d'éthyle à partir du milieu AF solide de la souche S1,
- extraits acétate d'éthyle et acétone à partir du milieu AF solide de la souche S2.

4- Étude du comportement chromatographique des molécules bioactives

4-1- Chromatographie sur papier

La technique réalisée est une chromatographie ascendante. Le papier utilisé est du papier Whatman N°1. Les extraits organiques des différentes souches étudiées (200µl de chaque extrait) sont déposés à 3 cm du bord inférieur du papier en plusieurs fois sous forme de spots à l'aide d'un capillaire. Chaque application est suivie par séchage à air froid pour donner la plus petite surface possible au dépôt. La cuve à chromatographie est saturée en vapeurs du solvant pendant deux heures avant d'introduire les feuilles de papiers dont le bord est immergé à une profondeur d'1 cm dans la phase mobile.

Les différents systèmes de solvants utilisés sont :

- Système toluène saturé
- Système butanol -acide acétique -eau (3 :1 :1)

- Système éther de pétrole
- Système butanol saturé
- Système butanol -méthanol (1 :1)
- Système toluène -cyclohexane (1 :1)
- Système toluène -méthanol (1 :1)
- Système toluène -chloroforme (1 :1)
- Système toluène -éther de pétrole- acétone (20 :5 :10)

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance de 15 cm à partir du point de dépôt. Le solvant est éliminé par évaporation à température ambiante avant de passer à la révélation des chromatogrammes.

4-1-1- Révélation par les vapeurs d'iode

Les molécules bioactives sont révélées sur le papier en utilisant les vapeurs d'iode : 10 à 20 grammes de cristaux d'iode sont introduits dans une cuve parfaitement étanche et sont laissés une période suffisante pour saturation complète de la cuve, les chromatogrammes sont ensuite introduits pendant quelques minutes. Après avoir retiré le papier, l'iode sublime rapidement et les emplacements des molécules bioactives se colorent en brun. Leurs rapports frontaux (Rf) sont calculés d'après la relation :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par les molécules bioactives}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

4-1-2- Révélation microbiologique des chromatogrammes

Les chromatogrammes sont coupés en bandes de 1 cm de largeur et déposés sur la surface d'un milieu Mueller-Hinton gélosé préalablement ensemencé par une bactérie-test. Les boîtes sont placées à +4°C pendant deux heures et les zones d'inhibition sont notées après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

4-2- Chromatographie sur couche mince

Des plaques de gel de silice « 60F254 » sur support d'aluminium, prêtes à l'emploi, ont été utilisées. 200µl des extraits sont déposés progressivement, à l'aide de capillaire sous forme de spots à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque avec séchage entre chaque

application. Les cuves rectangulaires utilisées contiennent 100ml de solvants. L'atmosphère des cuves est saturée pendant deux heures avec les vapeurs de solvants cités ci-dessous, avant d'introduire les plaques de silice.

Les systèmes de solvants utilisés sont :

- Système butanol saturé
- Système butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1)
- Système butanol-méthanol (1 :1)
- Système toluène-cyclohexane (1 :1)
- Système toluène saturé
- Système toluène-méthanol (1 :1)
- Système toluène-acétone (6 : 4)
- Système toluène-acide acétique (8 : 2).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance de 10 cm à partir du point de dépôt. Après élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV ($\lambda = 254$ et 365 nm). Les spots qui apparaissent sont grattés et déposés à la surface du milieu Mueller Hintonensemencée avec la bactérie-test pour mettre en évidence leur activité antibactérienne. Après pré-diffusion à $+4^{\circ}\text{C}$ et incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, les Rf des spots présentant une activité sont calculés.

Résultats et discussion

1- Étude de la solubilité des substances bioactives

1-1- Extraction à partir de milieu liquide

Les résultats obtenus avec l'extrait à l'acétate d'éthyle du surnageant de la culture de la souche S1 ne présente aucune activité cellulaire sur toutes les bactéries-tests utilisées. En revanche, l'activité antibactérienne apparaît avec l'extrait butanolique et l'extrait au toluène. Dans ce dernier, elle est plus importante. Par ailleurs, l'extrait méthanolique du mycélium ne montre qu'une faible activité contre *B.cereus* (**Figure 36**).

L'apparition de l'activité antibactérienne dans un solvant polaire (le butanol) et un autre apolaire (le toluène), suppose qu'il s'agit soit de plusieurs molécules de polarité différente (soluble chacune dans un solvant différent) ou bien une ou plusieurs molécules

solubles dans des solvants variés. Cette dernière hypothèse est plus probable puisque selon **Guernet et Hamon (1981)**, les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entraînant une affinité pour des solvants très divers.

À l'exception de l'extrait butanolique, il y'a absence totale d'activité antibactérienne dans les autres extraits organiques des surnageant des cultures de la souche S2 (**Figure 37**). Ces résultats laissent supposer, d'une part, la présence de molécules bioactives polaires et confirment d'autre part, les constatations faites dans le chapitre précédent. En effet, les activités sont conservées même après extraction.

1-2- Extraction à partir de milieu solide

Tous les extraits organiques étudiés des deux souches présentent des activités antibactériennes (**Figures 38 et 39**), ce qui montre que l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle du milieu liquide. En effet, la production d'antibiotiques à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide. Il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide (**Shomura et al., 1979**). Cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces* fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas, 2001**) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin, 1999**), cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide. Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus dans le test de mise en évidence et qui ne sont retrouvés qu'après extraction à partir de milieux solides. D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* comme **Bussari et al. (2008)**.

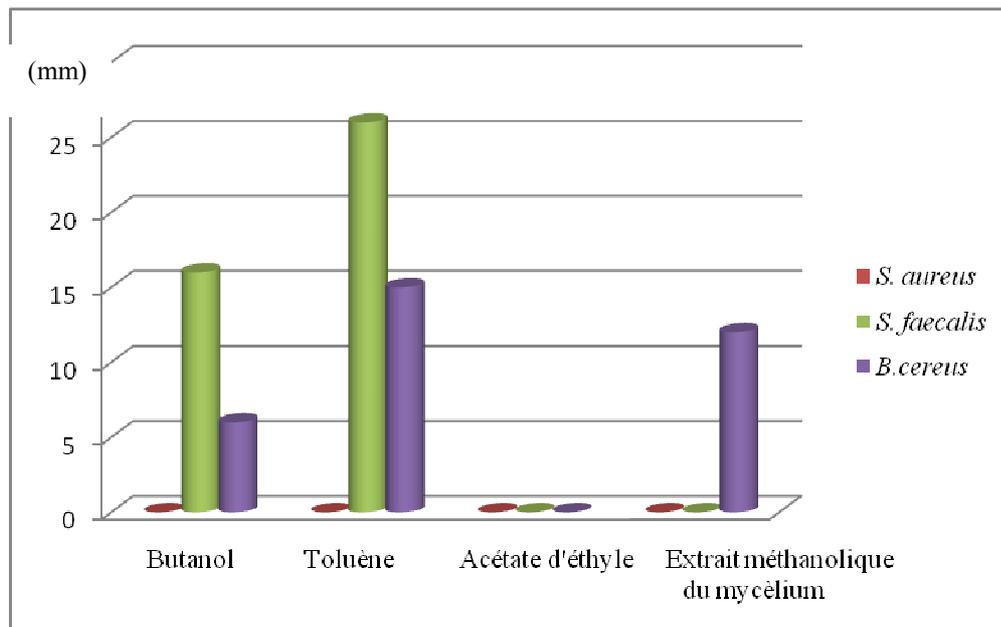


Figure 36. Activité des extraits organiques du milieu liquide de la souche S1.

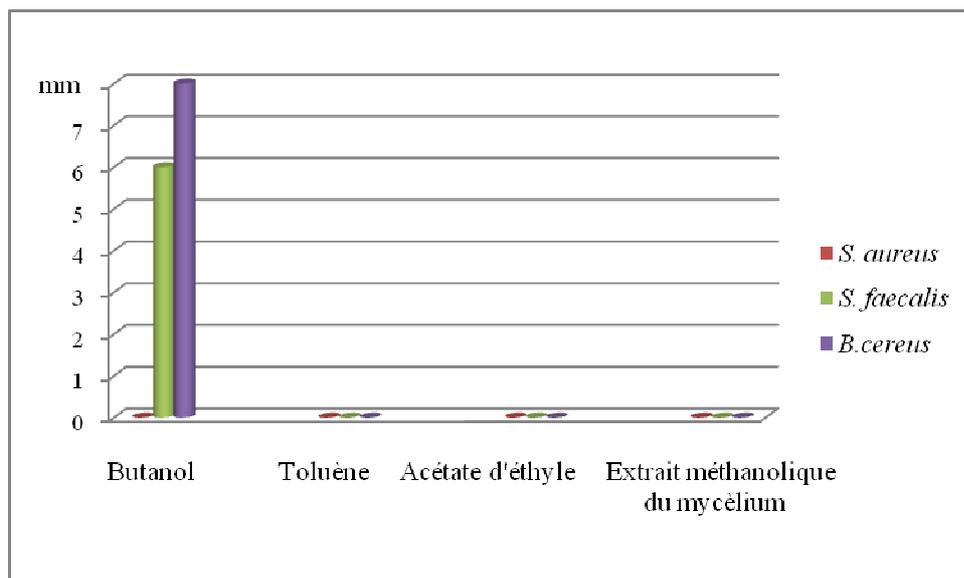


Figure 37. Activité des extraits organiques du milieu liquide de la souche S2.

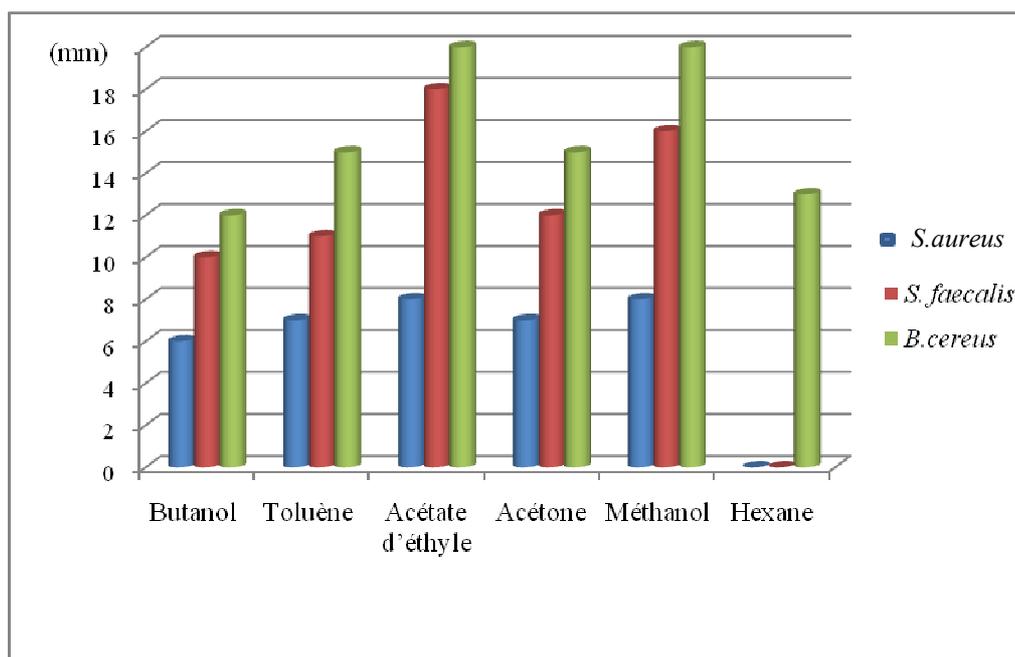


Figure 38. Activité des extraits organiques du milieu solide de la souche S1.

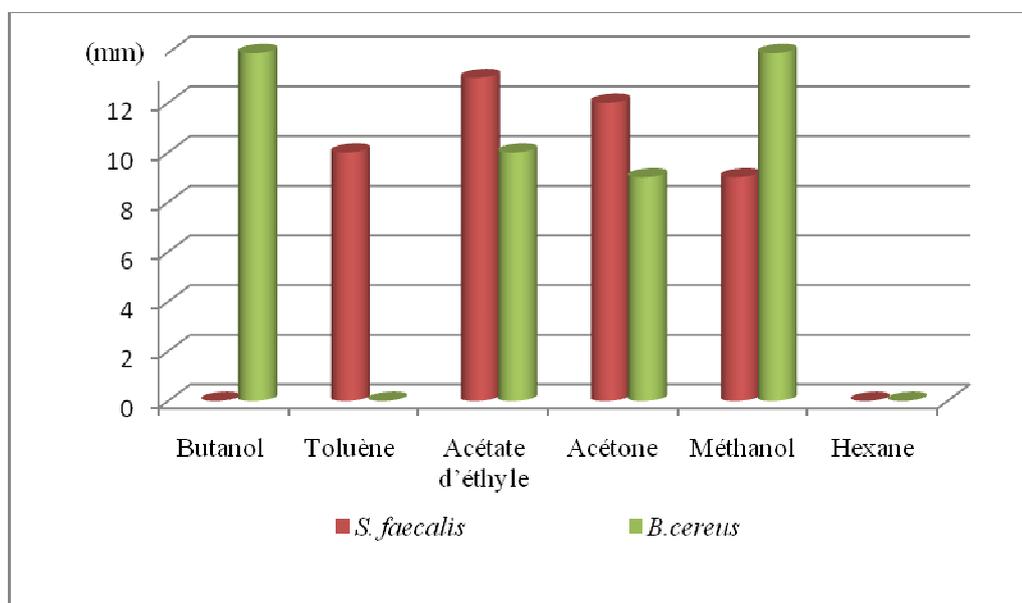


Figure 39. Activités des extraits organiques du milieu solide de la souche S2.

En se basant sur ces résultats, notre travail d'analyse s'est poursuivi sur les extraits suivants :

- extrait à l'acétate d'éthyle à partir de milieu solide de la souche S1,
- extrait à l'acétate d'éthyle à partir de milieu solide de la souche S2,
- extrait au toluène à partir de milieu liquide de la souche S1,
- extrait à l'acétone à partir de milieu solide de la souche S2.

2- Étude de la stabilité thermique des molécules bioactives

L'activité antibactérienne de l'extrait au toluène, à partir du milieu liquide de la souche S1, est stable aux variations de température et à l'exposition à la lumière. En effet, les valeurs de diamètres d'inhibition, pour chaque température (50°C, 70°C et 100°C) sont voisines et ceci pour les deux bactéries-tests et presque équivalentes à celles de l'extrait sans traitement (témoin) contre *B.cereus*. L'activité du même extrait est toujours présente après trois semaines à température ambiante, exposé ou non à la lumière (**Figure 40**).

L'activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de la même souche obtenu à partir du milieu solide, résiste également aux températures élevées (jusqu'à 100°C) et à l'exposition à la lumière pendant trois semaines ce qui apparaît clairement contre *S. faecalis* dont le diamètre d'inhibition diminue faiblement aux températures élevées et reste stable à température ambiante à la lumière comme à l'obscurité (**Figure 40**).

Les deux extraits de la souche S2 obtenus à partir du milieu solide, présentent des activités antibactériennes qui diminuent faiblement après des chauffages à 50°C, 70°C et 100°C par rapport au témoin mais semblent être plus stables contre *B.cereus* dont les valeurs des diamètres d'inhibition sont égales à celles du témoin (dans le cas de l'extrait d'acétone). Ces deux extraits sont également stables à température ambiante (lumière et obscurité) essentiellement contre *S.faecalis* (**Figure 41**).

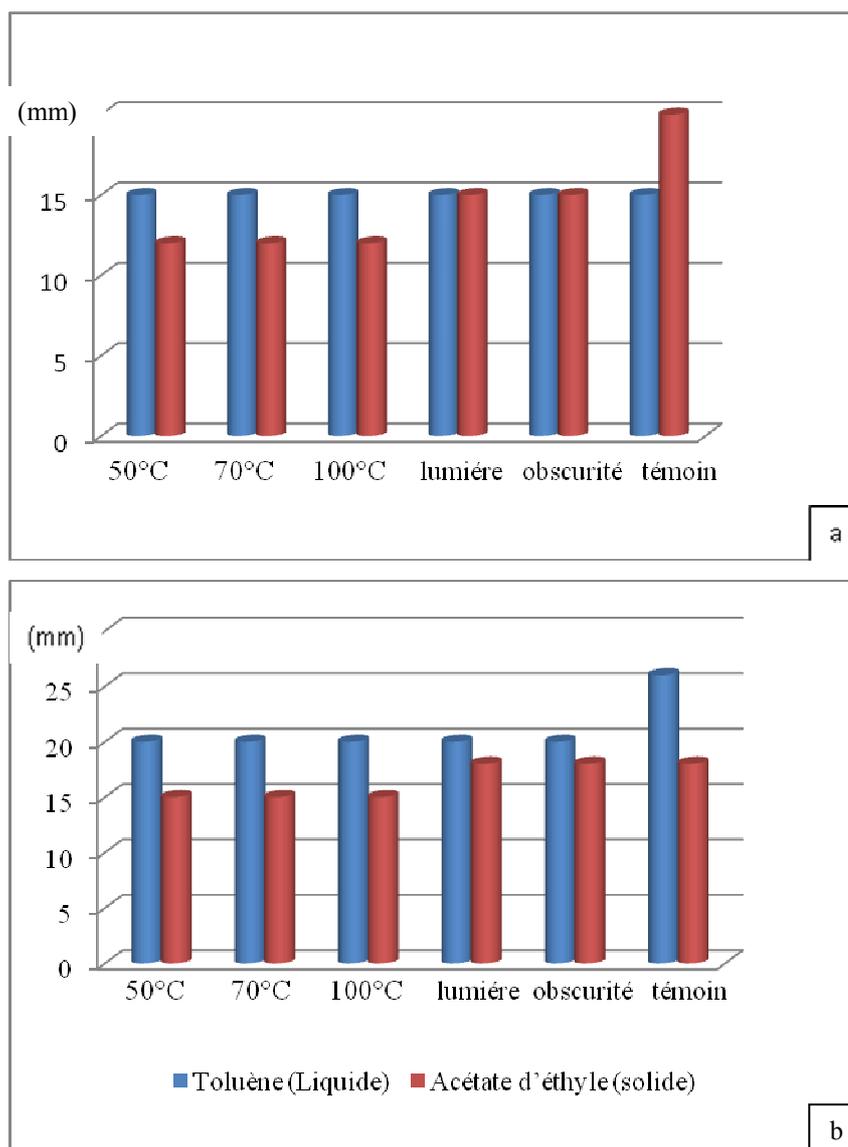


Figure 40. Activité des extraits organiques de la souche S1 à différentes températures contre : (a) *B.cereus* (b) *S.faecalis*.

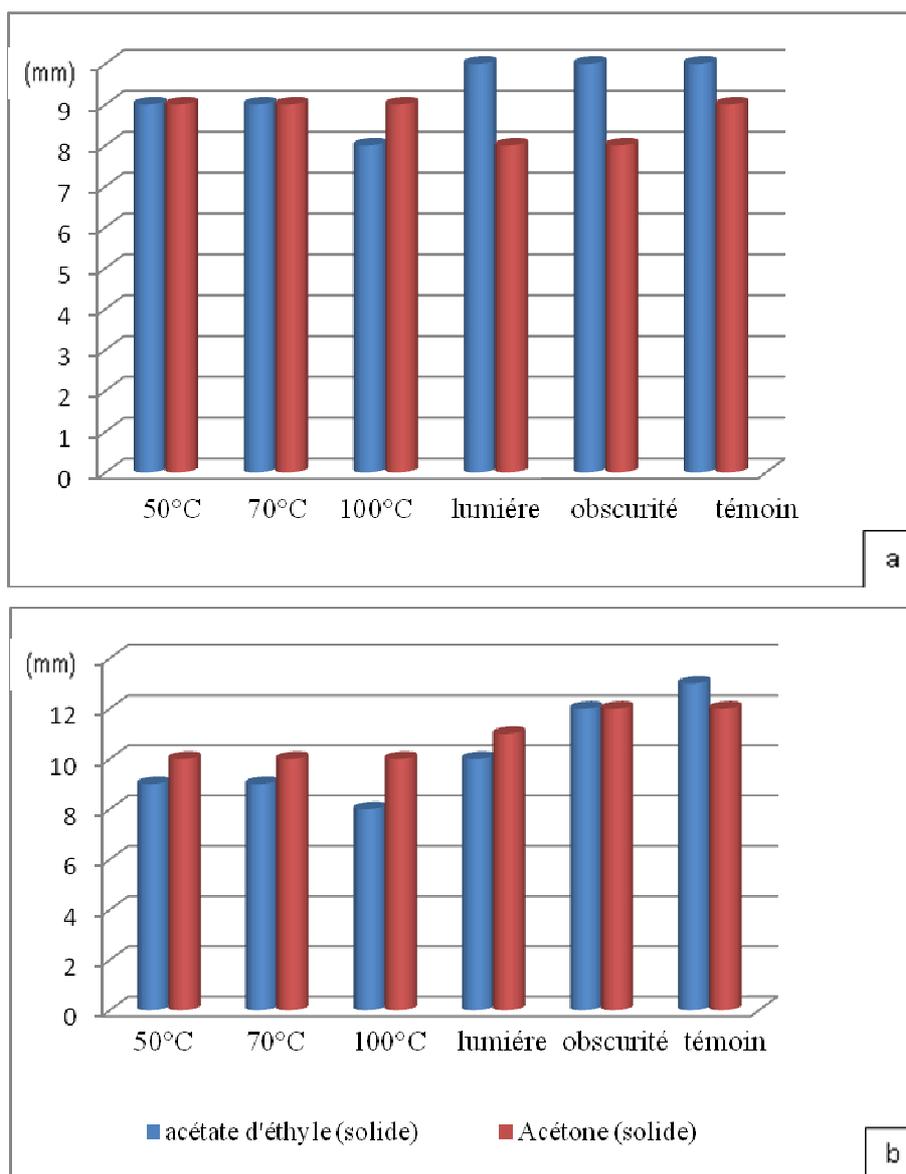


Figure 41. Activité des extraits organiques de la souche S2 à différentes températures contre : (a) *B.cereus* (b) *S.faecalis*.

3- Étude de la cinétique de l'activité antibactérienne des extraits organiques

Comme il a été constaté dans l'étude cinétique des molécules bioactives avant extraction, l'activité antibactérienne des extraits organiques de toutes les souches étudiées, apparaît dès le premier jour avec des valeurs de diamètres d'inhibition importantes, cependant, la valeur maximale est atteinte à des périodes différentes : dans le cas de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S2, l'activité apparaît avec une valeur maximale après 24 heures, pour les autres extraits organiques le maximum d'activité est atteint au 4^e jour pour la souche S1 (extrait d'acétate d'éthyle et de toluène) et au 3^e jour pour l'extrait acétone de la souche S2 (**Figure 42**). En effet, l'étape d'extraction permet de concentrer les molécules bioactives et est considérée comme une première purification (**Chaubal et al., 1995 ; Burianek et Yousef, 2000**), ainsi un disque contenant des molécules pré purifiées donne des valeurs de diamètres d'inhibition plus nettes que celles données par un cylindre d'Agar.

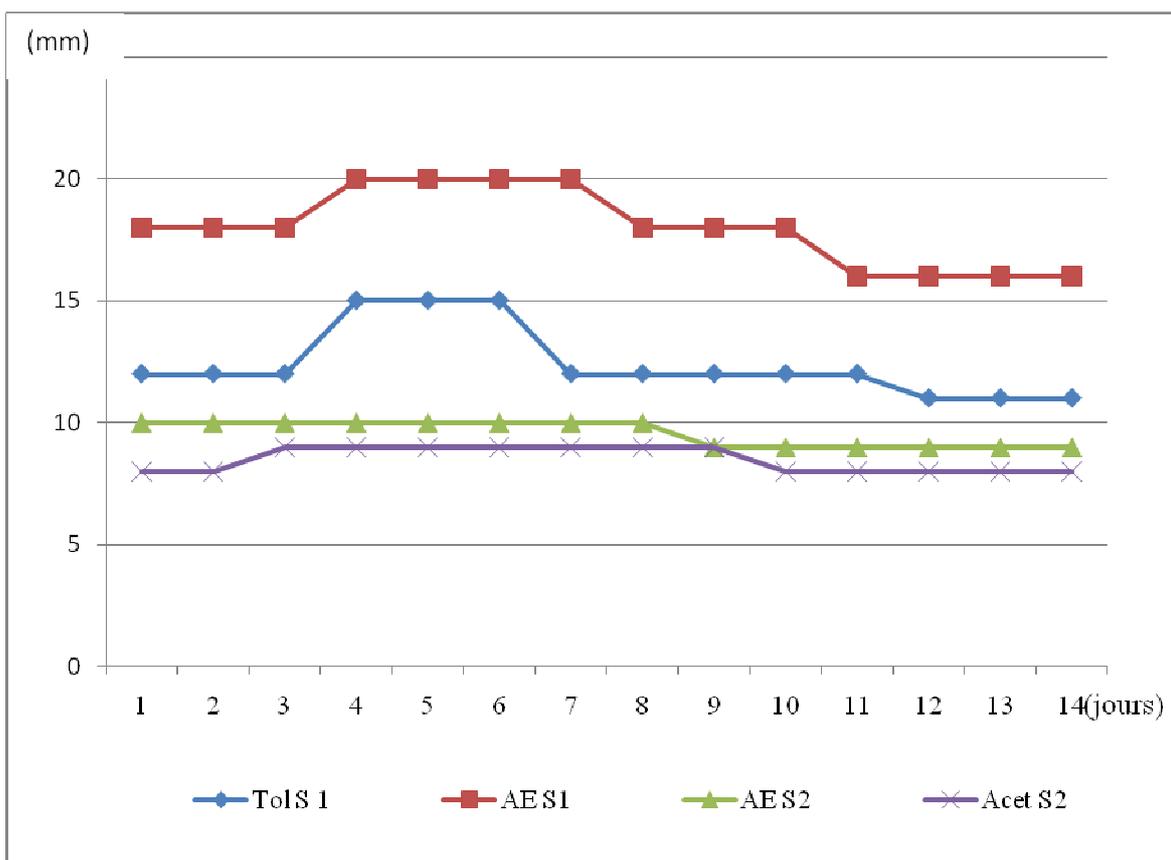


Figure 42. Cinétique de l'activité antibactérienne des extraits organiques des souches S1 et S2.

4- Étude du comportement chromatographique des molécules bioactives

4-1- Chromatographie sur papier

Deux taches au maximum apparaissent sur la totalité des chromatogrammes avec les différents extraits étudiés, et ceci quel que soit le système solvants utilisé (**Tableau 17**). Une seule tache seulement est active dans certains systèmes solvants, ce qui suppose qu'il n'y a pas eu de séparation de molécules bioactives ou bien il y'a présence d'une seule molécule, alors que dans d'autres, on constate une absence totale d'activité antibactérienne des taches ; ceci peut être expliqué par une diminution de la concentration des molécules bioactives sur le chromatogramme après migration et séparation.

Les molécules bioactives de l'extrait au toluène de la souche S1 présentent un caractère apolaire puisqu'elles migrent dans les systèmes apolaires (système toluène-cyclohexane (1 :1), système toluène-éther de pétrole- acétone (20 :5 :1) et système toluène saturé), celles de l'extrait acétate d'éthyle de la même souche sont de polarité médiane puisqu'elles ne migrent pas dans les systèmes toluène saturé et toluène-cyclohexane (1 :1) et migrent aux rapports 0,69 dans le système toluène-méthanol (1 :1) et 0,99 dans le système butanol-méthanol (1 :1).

Les molécules bioactives de la souche S2 extraites par l'acétate d'éthyle et l'acétone sont polaires puisqu'elles migrent dans les systèmes polaires (0,99 et 0,96 dans le système butanol-méthanol (1 :1), 0,98 et 1 dans le système butanol saturé et 0 dans le système toluène saturé).

4-2- Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince semble donner de meilleures séparations par rapport à la chromatographie sur papier avec l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S2 où on observe la présence de deux taches actives dans certains systèmes solvants (**Tableau 18**), en plus de l'apparition d'activités antibactériennes importantes (grand diamètre d'inhibition) de quelques taches comme la tache à $R_f=0,76$ dans le système butanol saturé de l'extrait acétate d'éthyle de la souche S1 et les taches aux rapports 0,19 et 0,88 dans le système toluène saturé de l'extrait acétate d'éthyle de la souche S2. Pour l'extrait à l'acétone de la souche S2, on n'a pas obtenu plus d'une tache active (ce qui est constaté dans les systèmes toluène saturé et toluène-méthanol (1 :1)).

Tableau 17. Résultat de la chromatographie sur papier des différents extraits organiques.

Systèmes solvant	Rapports frontaux (Rf)								
	Toluène saturé	ac. acétique – eau (3 : 1 : 1) Butanol	Ether de pétrole	Butanol saturé	Butanol-méthanol (1 : 1)	Toluène chloroforme (1 : 1)	Toluène-cyclohexane (1 : 1)	Toluène-méthanol (1 : 1)	Toluène – éther de pétrole-acétone (20 : 5 : 10)
Extractions organiques									
Toluène de la souche S1	0,95*	0-0,89	0,91	0,96	0,98	0,3-1	0,98*	0,95	0,85-0,97*
Acétate d'éthyle de la souche S1	0*-0,87	0,95	0-0,98	0,97	0,99*	0,02	0,05*	0,69* -0,93	0-0,98
Acétone de la souche S2	0*	0-0,96*	0-0,95	0,1-0,98*	0-0,99*	0-0,95	0*-0,95	0,98	0-0,96*
Acétate d'éthyle de la souche S2	Trainé	Trainé	0-0,95	1*	0,96*	0	0	0,55*	0-0,94*

(*) : tache présentant une activité antibactérienne

Les molécules bioactives de la souche S1 extraites à l'acétate d'éthyle présentent un caractère polaire puisqu'elles migrent dans les systèmes butanol saturé et butanol-acide acétique-eau (3 : 1 : 1) à des rapports de 0,76 et 0,87 respectivement, et restent à l'emplacement du dépôt dans le système toluène-cyclohexane (1 : 1), c'est probablement le même type de molécules dans les trois cas parce qu'elles absorbent toutes aux deux longueurs d'ondes d'UV.

L'extrait toluène de la souche S1 a donné dans la totalité des systèmes solvants une seule tache à l'exception du système toluène saturé où il y'a deux taches sans activité. L'activité antibactérienne de la souche S2 présente dans les deux taches observées, un caractère polaire pour la première (à Rf 0,19 dans le système toluène saturé) et un caractère apolaire pour la deuxième (à Rf 0,88 dans le système toluène saturé). Les deux autres taches actives obtenues avec le système butanol-acide acétique-eau (3 : 1 : 1) possèdent des caractères (de solubilité) très proches des deux premières : la tache apolaire à Rf 0,07 absorbant aux deux longueurs d'onde d'UV (comme la deuxième du système toluène saturé) et la tache assez polaire à Rf 0,66 absorbant à 365nm (comme la première du système toluène saturé).

Tableau 18. Résultat de la chromatographie sur couche mince des différents extraits organiques.

Rapports frontaux					
Extraits organiques	Toluène de la souche S1	Acétate d'éthyle de la souche S1	Acétate d'éthyle de la souche S2	Acétone de la souche S2	
Systèmes solvant					
Butanol saturé	0,8 ⁽²⁾ *	0,76 ^(1,2) *	0 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	
			0,17 ⁽¹⁾	0,6 ⁽¹⁾	
		0,93 ^(1,2)	0,3 ⁽¹⁾	0,82 ⁽¹⁾	
		0,97 ⁽²⁾			
Butanol ac acétique-eau (3 :1 :1)	0,8 ⁽²⁾ *	0,87 ^(1,2) *	0,07 ^(1,2) *	0,47 ⁽¹⁾	
		0,91 ⁽²⁾	0,46 ⁽¹⁾	0,57 ⁽¹⁾	
			0,66 ⁽¹⁾ *	0,65 ⁽¹⁾	
			0,9 ⁽¹⁾		
Butanol-méthanol (1 :1)	0,87 ⁽²⁾ *	0,60 ⁽¹⁾	0,61 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	
		0,86 ⁽²⁾	0,90 ⁽²⁾	0,76 ⁽¹⁾	
				0,87 ⁽¹⁾	
Toluène-cyclohexane (1 :1)	0 ⁽¹⁾	0 ^(1,2) *	0,13 ⁽¹⁾ *	0 ^(1,2)	
				0,33 ⁽²⁾	
				0,45 ⁽²⁾	
Toluène saturé	0 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	0,19 ⁽¹⁾ *	0 ⁽¹⁾ *	
				0,47 ⁽²⁾	
				0,88 ^(1,2) *	
Toluène-méthanol (1 :1)	0,66 ⁽²⁾ *	0,6 ^(1,2)	0,48 ⁽¹⁾ *	0,57 ⁽¹⁾ *	
		0,78 ⁽²⁾	0,66 ⁽¹⁾	0,83 ⁽¹⁾	
			0,86 ⁽²⁾		
			0,96 ⁽²⁾		
Toluène-acétone (6 :4)	0,96 ⁽²⁾	0,17 ⁽²⁾	0 ⁽¹⁾	0 ^(1,2)	
		0,98 ⁽²⁾	0,66 ⁽¹⁾	0,44 ⁽¹⁾	
			0,85 ⁽²⁾		
Toluène- ac acétique (8 :2)	0,62 ⁽²⁾	0,06 ^(1,2)	0 ⁽¹⁾	0 ^(1,2)	
				0,32 ⁽¹⁾	
				0,77 ⁽¹⁾	
				0,86 ⁽¹⁾	

(*) : tache présentant une activité antibactérienne

⁽¹⁾ tache révélée à 365nm

⁽²⁾ tache révélée à 254nm

La souche S2 produit donc au moins deux molécules antibactériennes sur milieu AF, généralement les *Streptomyces* ont la capacité de produire plusieurs antibiotiques sur le même milieu ou sur des milieux différents (**Davelos *et al.*, 2004**).

L'activité antibactérienne est observée chez les taches de certains systèmes solvants et pas dans d'autres ce qui peut être expliqué par la diffusion des molécules bioactives dans le gel ce qui diminue leur concentration (dilution).

Séparation et purification des molécules antibactériennes

L'étude des activités antibactériennes des souches d'actinomycètes nous a permis de sélectionner les meilleurs temps de production des molécules antibactériennes, les meilleurs extraits organiques de ces molécules et les meilleures techniques chromatographiques de séparation avec les meilleurs systèmes de migration. Ainsi le criblage secondaire, étape centrale dans la stratégie de recherche de nouveaux antibiotiques, peut être effectué.

Les travaux présentés dans ce chapitre concerne l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) et de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative et analytique dans le but de séparer et purifier les molécules bioactives des deux extraits organiques : extrait de l'acétate d'éthyle de la souche S1 (codé S1AE) et extrait d'acétate d'éthyle de la souche S2 (codé S2AE).

Matériel et méthodes

1- Séparation et purification des molécules antibactériennes de la souche S1

1-1- CCM analytique bidimensionnelle

Une chromatographie bidimensionnelle est réalisée. La première et la deuxième dimension sont effectuées, respectivement, dans le système butanol saturé dans les mêmes conditions citées dans le chapitre 3 et dans le système hexane-acide acétique (9 :1). Après la migration de l'extrait S1AE dans le système butanol saturé et la révélation des taches sur le chromatogramme, ce dernier est retourné de 90° puis déposé dans le système hexane- acétate d'éthyle (9 :1) pour une 2^e migration. Enfin le chromatogramme est séché et les taches sont repérées sous une lampe UV à deux longueurs d'onde 254 et 365 nm.

1-2- Comparaison des activités antibactériennes des deux extraits S1AE et S1Tol

L'activité antibactérienne de l'extrait S1AE obtenu à partir de la culture de la souche S1 sur milieu AF solide est comparée avec celle de l'extrait toluénique obtenu à partir de la culture de la souche S1 sur milieu AF liquide. Pour cela, des CCM analytiques sont réalisés en déposant les deux extraits sur la même plaque, les taches obtenues après migration dans le système hexane- acide acétique (9 :1), sont repérées avec une très grande

précision et le chromatogramme est introduit dans un densitomètre « CD60-Desaga Sarstedt », cet appareil permet de balayer les différentes longueurs d'onde pour mesurer l'absorbance en UV de chaque tache et ceci en employant le logiciel « Desaga Proquant 5 ». Enfin, une révélation microbiologique des différentes taches est réalisée selon la technique décrite dans le chapitre précédent.

1-3- CCM préparative

Cette technique a pour but de récupérer les molécules bioactives, ce qui permet de les concentrer d'une part et de déterminer leurs proportions en (P/P) dans l'extrait brut, d'autre part. Une quantité de 100µl (d'une concentration de 115,4mg/ml) de l'extrait S1AE est déposée en trait sur une plaque de silice prête à l'emploi. Après migration dans le système butanol saturé, la fraction active (F1) est repérée, grattée, suspendue dans le même solvant d'extraction et soumise aux ultrasons pendant quelques secondes dans un appareil « Branson 2510 » puis filtré. Le filtrat est évaporé à sec, pesé et déposé sur disque de papier Whatman pour le tester contre *B.cereus* et *S. faecalis* (technique des disques). En parallèle, l'activité antibactérienne d'une quantité connue d'extrait brut (S1AE), comme témoin, est testée contre les mêmes souches-tests.

1-4- Purification par HPLC

1-4-1- HPLC analytique

L'appareil « 1100 de Agilent » contient différents compartiments superposés, en haut le dégazeur dont les systèmes solvants traversent en premier, la pompe et enfin l'injecteur appelé rhéodine, ce dernier permet d'injecter un gradient continu acétonitrile-eau : 30% à 100% avec un débit de 0,7ml/mn dans une colonne C18 (phase inverse) de marque « EC 250/4.6 nucleodur ». L'échantillon (fraction F1 et extrait brut S1AE) de taille 20µl, est placé dans des pellilés (12x32mm) munis de petits tubes de marque « Microsolv ». Les pellilés sont placés dans l'appareil et l'échantillon est injecté automatiquement dans la colonne. Enfin, un détecteur donne l'absorbance à une longueur d'onde fixe d'ultraviolet des molécules éluées. Tout l'appareil est sous la commande d'un logiciel « 1100 de Agilent » qui permet la réalisation de l'élution dans des conditions précises et le traitement des résultats obtenus.

Avant d'être injecté, le système solvant (acétonitrile et eau) est filtré sur membrane millipore 0,45µm puis additionné de quelques gouttes d'une solution à 0,4% d'acide formique.

1-4-2- HPLC préparative

Cette technique a pour but la récupération des différentes fractions de l'échantillon F1 : (F1a : de 0 à 7,5 mn, F1b : de 7,5 à 11,5mn, F1c : de 11,5 à 52mn) selon les résultats de l'HPLC analytique. Elle est réalisée dans les mêmes conditions décrites dans le paragraphe précédent, à l'exception de la taille d'échantillon qui est de 80µl. Cette HPLC est réalisé en plusieurs tours (ou *runs*) afin de collecter la plus grande quantité possible de chaque fraction. Ces dernières sont séchées à sec au rotavapor « Buchi 111 » à 40°C et pesées puis subissent toutes une CCM analytique avec le système butanol saturé (contrôle de pureté). Enfin, l'activité antibactérienne de chaque fraction est testée par la technique des disques.

2- Séparation et purification des molécules antibactériennes de la souche S2

2-1- CCM analytique bidimensionnelle

Après migration dans les deux sens de l'extrait S2AE dans le meilleur système de séparation déterminé dans la partie « étude préliminaire des activités antibactériennes » (système toluène saturé), le chromatogramme est séché puis placé dans un densitomètre « CD60-Desaga Sarstedt » afin de mesurer l'absorbance en UV de chaque tache repérée.

2-2- CCM préparative

Pour récupérer et concentrer les molécules bioactives de l'extrait S2AE, 100µl (de concentration de 18,3mg/ml) de ce dernier sont déposés en trait sur des plaques de silice prêtes à l'emploi. Après migration et séchage, les taches obtenues sont repérées, grattées, remises en solution dans le même solvant, soumises aux ultrasons, filtrées, évaporées à sec puis pesées et déposées sur disque pour enfin tester leur activité antibactérienne contre *B.cereus* et *S. faecalis*.

2-3- Étude de l'effet synergique de l'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait S2AE

Ce test est réalisé sur les trois fractions (T1, T2, T3) de l'extrait S2AE. Les différentes fractions sont déposées à raison de 120µg d'extrait sur le même disque de papier Whatman N°1 (des disques à trois fractions et des disques à deux fractions T1 et T3) et sont testés après séchage contre les souches *B. cereus* et *S. faecalis*. En parallèle, des disques des fractions séparées et de l'extrait brut sont testés avec la même quantité contre les mêmes souches tests.

2-4- Purification par HPLC

2-4-1- HPLC analytique

Une analyse par HPLC des échantillons : extrait brut S2AE, fraction T1 et fraction T3, est réalisé par un appareil « 1100 de Agilent » qui contient les différentes parties citées dans le paragraphe 1-4-1, la chromatographie est réalisée en phase inverse avec un gradient continu acétonitrile-eau : 30% à 100% et un débit de 0,7ml/mn dans la colonne, la taille d'échantillon est de 20µl. Les molécules sont détectées par un détecteur d'absorbance en UV.

2-4-2- HPLC préparative

Afin de récupérer les différentes fractions des deux taches T1 (T1a: de 0 à 20 mn, T1b: 20 à 40 mn, T1c : 40 à 44 mn, T1d : 44 à 50 mn et T1e : 50 à 52 mn) et T3 (T30 : 0 à 28mn, T3a : 28 à 31mn, T3b : 31 à 33mn, T3c : 33 à 39 mn, T3d : 39 à 50 mn et T3e : 50 à 52 mn) de l'échantillon S2AE, une HPLC préparative a été réalisée dans les mêmes conditions de l'HPLC analytique avec une taille d'échantillon de 80µl et plusieurs tours pour collecter la plus grande quantité possible. Après un contrôle de pureté par CCM, l'activité antibactérienne de chaque fraction récupérée et concentrée est testée par la technique des disques.

Résultats et Discussion

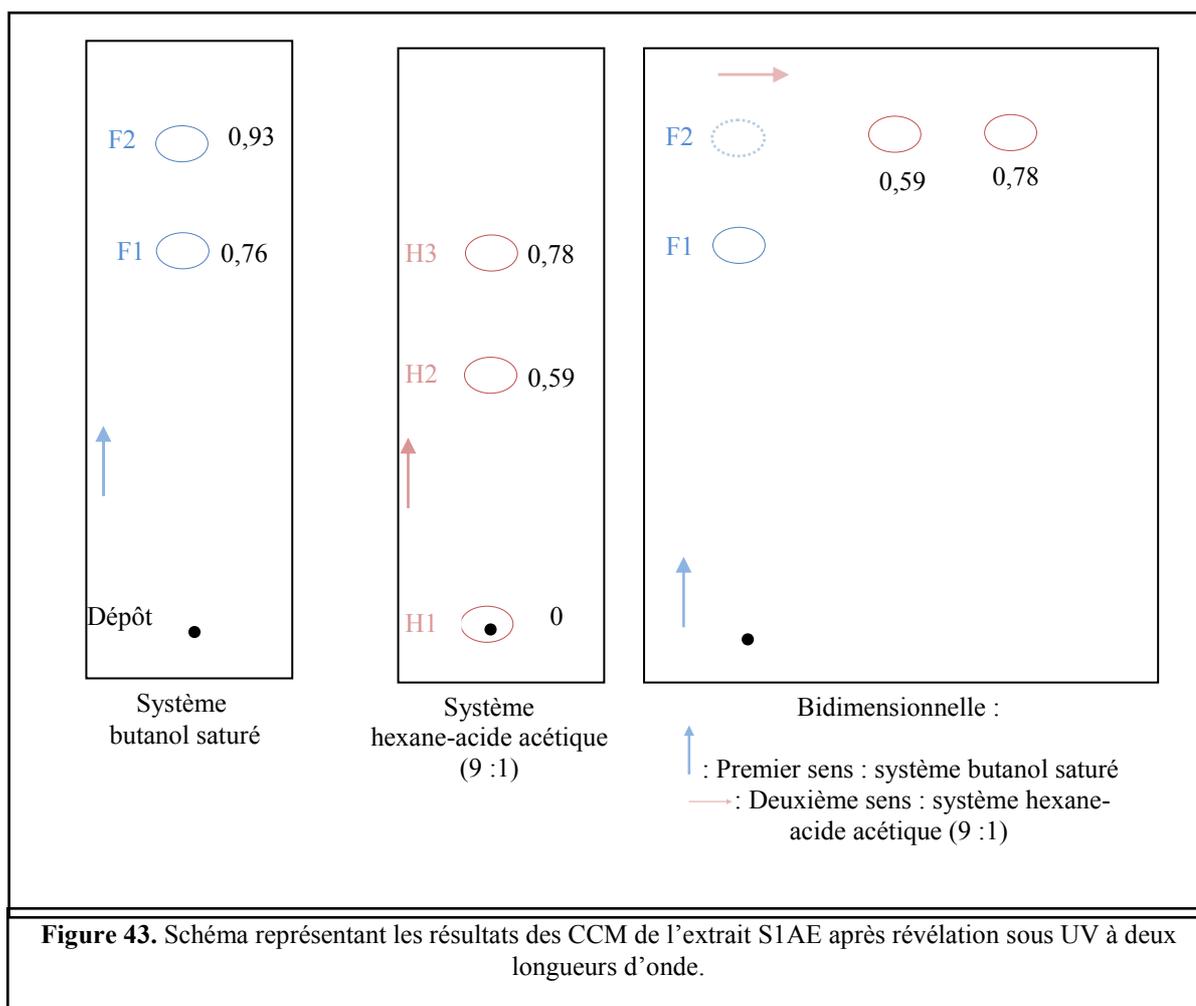
1- Souche S1

1-1- CCM analytique bidimensionnelle

La migration de l'extrait S1AE dans le système butanol saturé fait apparaître deux taches (F1 et F2) respectivement à 0,76 et 0,93. En revanche, le système hexane-acide acétique a donné trois taches de Rf 0 ; 0,59 et 0,78 codées respectivement H1, H2 et H3 et apparaissant toutes sous les deux longueurs d'onde d'UV. Cependant, dans la chromatographie bidimensionnelle, les deux taches obtenues avec le système butanol saturé et soumises à une deuxième migration dans le système hexane-acide acétique ne donnent que deux taches au lieu de trois (**Figure 43**). En effet, la fraction F1 (fraction active) ne se déplace pas dans le système hexane-acide acétique par contre la tache F2 donne deux autres taches. Ces résultats montrent donc que la tache H1 (Rf=0) obtenue dans la chromatographie unidimensionnelle avec le système hexane-acide acétique est la fraction F1 puisqu'elle ne se déplace pas dans ce dernier et semble être très polaire, par contre, les taches H2 et H3 sont deux composants de la fraction F2 (fraction inactive).

1-2- Comparaison des deux extraits S1AE et S1Tol

Le système hexane-acide acétique (9 :1) donne trois différentes taches (de Rf : 0-0,59-0,78) de l'extrait S1AE contre trois autres (à Rf : 0-0,59-0,9) de l'extrait S1Tol, le test d'activité antibactérienne montre que les fractions à Rf=0 dans les deux cas sont actives, alors que les quatre autres taches ne présentent aucune activité. Les spectres d'absorbance en UV des deux taches actives (**Figures 44 et 45**), montrent que les deux molécules absorbent les rayons UV à des longueurs d'onde très proches avec un maximum d'absorbance similaire à 270 nm, ce qui montre qu'il s'agit probablement de molécules très proches. Par ailleurs, il faut noter que les deux extraits S1AE et S1Tol proviennent, respectivement, des cultures de la souche S1 sur les milieux AF solide et liquide.



1-3- CCM préparative

Après récupération de la fraction active F1 et mesure de sa masse, il s'est avéré qu'elle constitue 7,8% (P/P) seulement de l'extrait brut S1AE. Cette fraction minoritaire présente par contre, une très forte activité qui représente plus de 90% de l'activité totale récupérée dans le solvant d'extraction (**Tableau 19**). Presque la totalité de l'activité antibactérienne de l'extrait brut S1AE est donc contenue dans cette fraction F1, ce qui confirme nos résultats sur la non activité des autres fractions de l'extrait brut.

Tableau 19. Activité antibactérienne de la fraction F1 par rapport à son extrait brut(S1AE)

Diamètre d'inhibition en mm contre :			
<i>B.cereus</i>		<i>S.faecalis</i>	
Extrait brut	Fraction F1	Extrait brut	Fraction F1
16	15	12	11

Spectrum 1: Position: X= 16,0mm Y= 17,0 mm

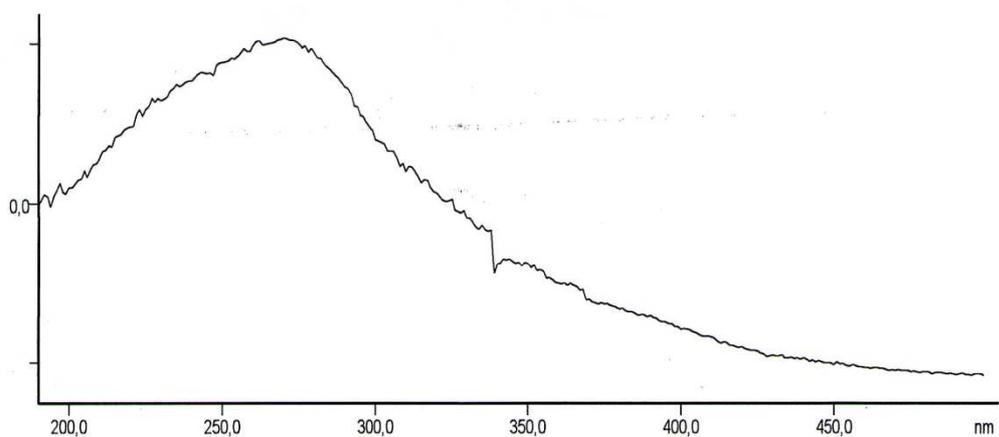


Figure 44. Spectre UV de la tache à Rf 0 de l'extract S1AE donné par le densitomètre (logiciel Desaga Proquant 5).

Spectrum 1: Position: X= 50,0mm Y= 18,0 mm

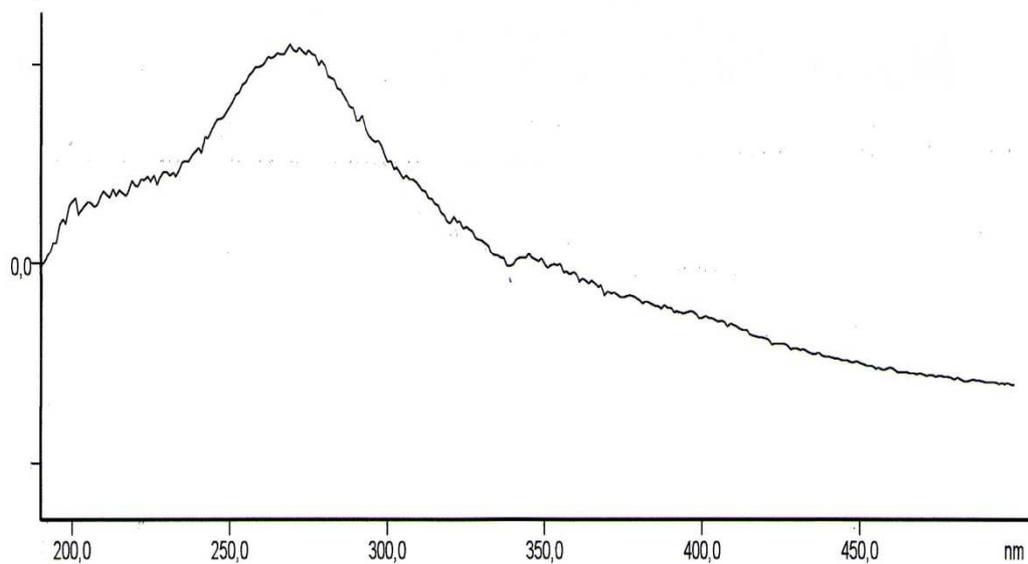


Figure 45. Spectre UV de la tache à Rf 0 de l'extract S1Tol donné par le densitomètre (logiciel Desaga Proquant 5).

1-4- Purification par HPLC

1-4-1- HPLC analytique

Les résultats de cette technique obtenus après détection par absorbance en UV à différents longueurs d'onde, de l'extrait brut S1AE et de la fraction F1 sont représentés respectivement dans les **figures 46** et **47**. La présence d'une multitude de molécules absorbant à différentes longueurs d'ondes (254, 280, 340 et 365nm) est observée dans l'extrait brut, en parallèle, on observe dans la fraction F1 une absorbance importante d'UV à trois longueurs d'onde (254, 280, 340 nm) à 6mn d'élution puis apparaissent deux autres faibles absorbances à 8 et 10 mn d'élution. En comparant les deux chromatogrammes (extrait brut et fraction F1), on constate que toutes les molécules de l'extrait brut sortant après 10 mn d'élution sont absentes du chromatogramme de la fraction F1, elles ont été éliminées pendant les premières techniques chromatographiques de séparation (CCM).

Ainsi, une HPLC préparative a été réalisée pour déterminer quelle est la fraction active entre les trois pics obtenus à partir de la fraction F1 (fraction au pic de 6mn, de 8mn et de 10mn).

1-4-2- HPLC préparative

Les résultats du test d'activité des trois fractions récupérées (F1a : de 0 à 7,5 mn, F1b : de 7,5 à 11,5mn, F1c : de 11,5 à 52mn) sont exposés dans le **tableau 20**. Seule la fraction (F1a) est active contre *B. cereus* et *S. faecalis*. Cette fraction, considérée comme pure, a été donc concentrée et séchée pour subir les différentes analyses structurales.

Tableau 20. Activité antibactérienne des trois fractions d'HPLC de l'extrait S1AE.

Diamètre d'inhibition en mm :					
contre <i>B.cereus</i>			contre <i>S.faecalis</i>		
F1a	F1b	F1c	F1a	F1b	F1c
12	00	00	10	00	00

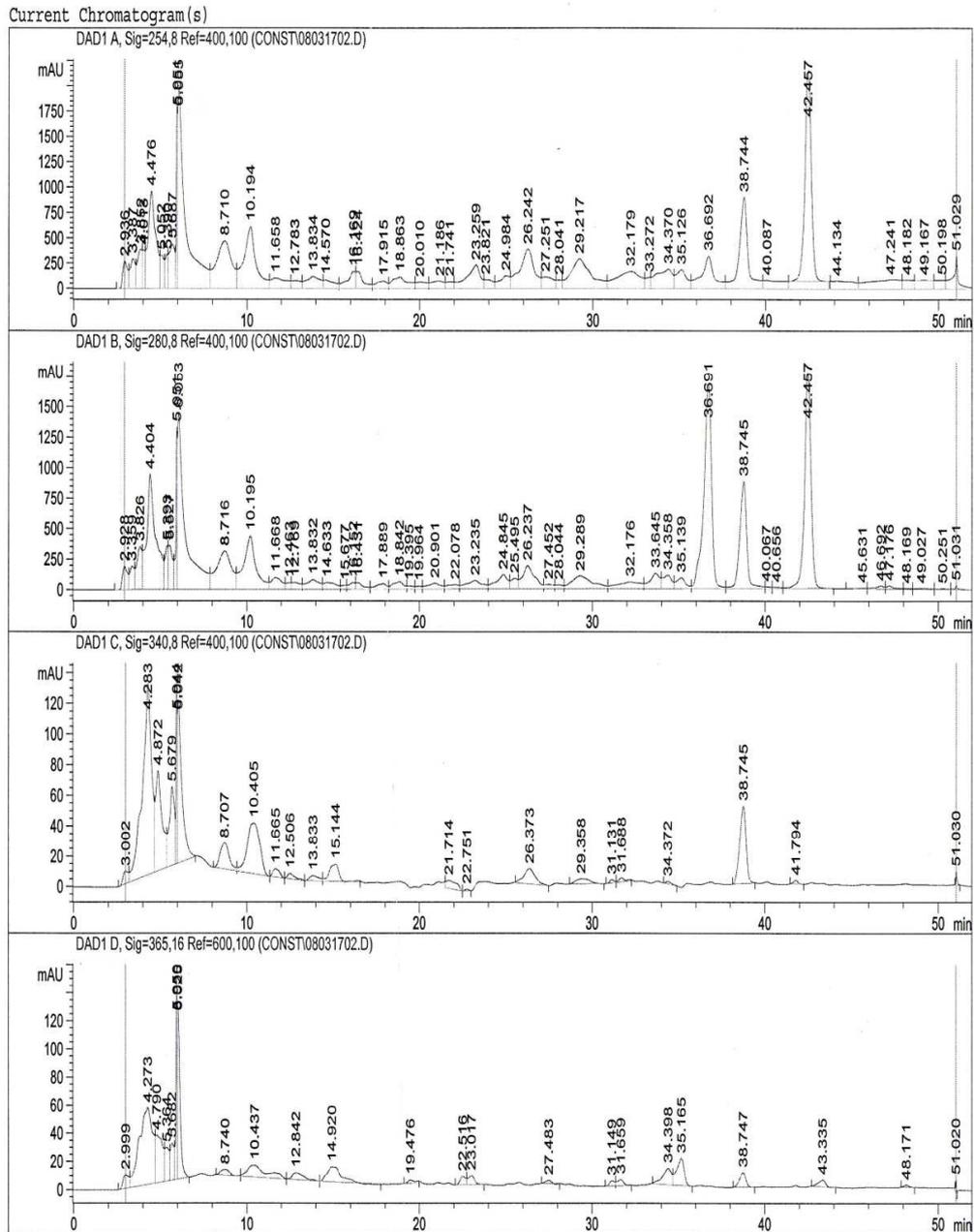


Figure 46. Profil chromatographique de l'extrait brut S1AE après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes (logiciel 1100 de Agilent).

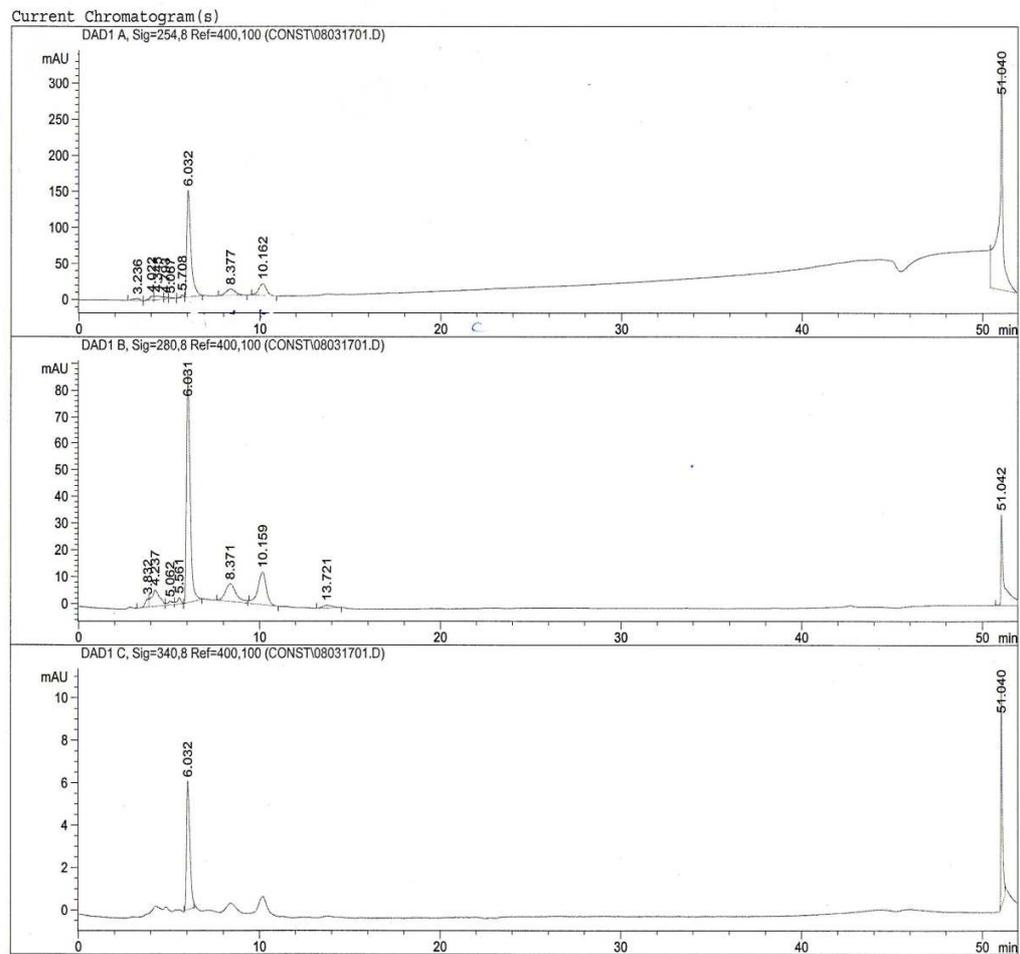
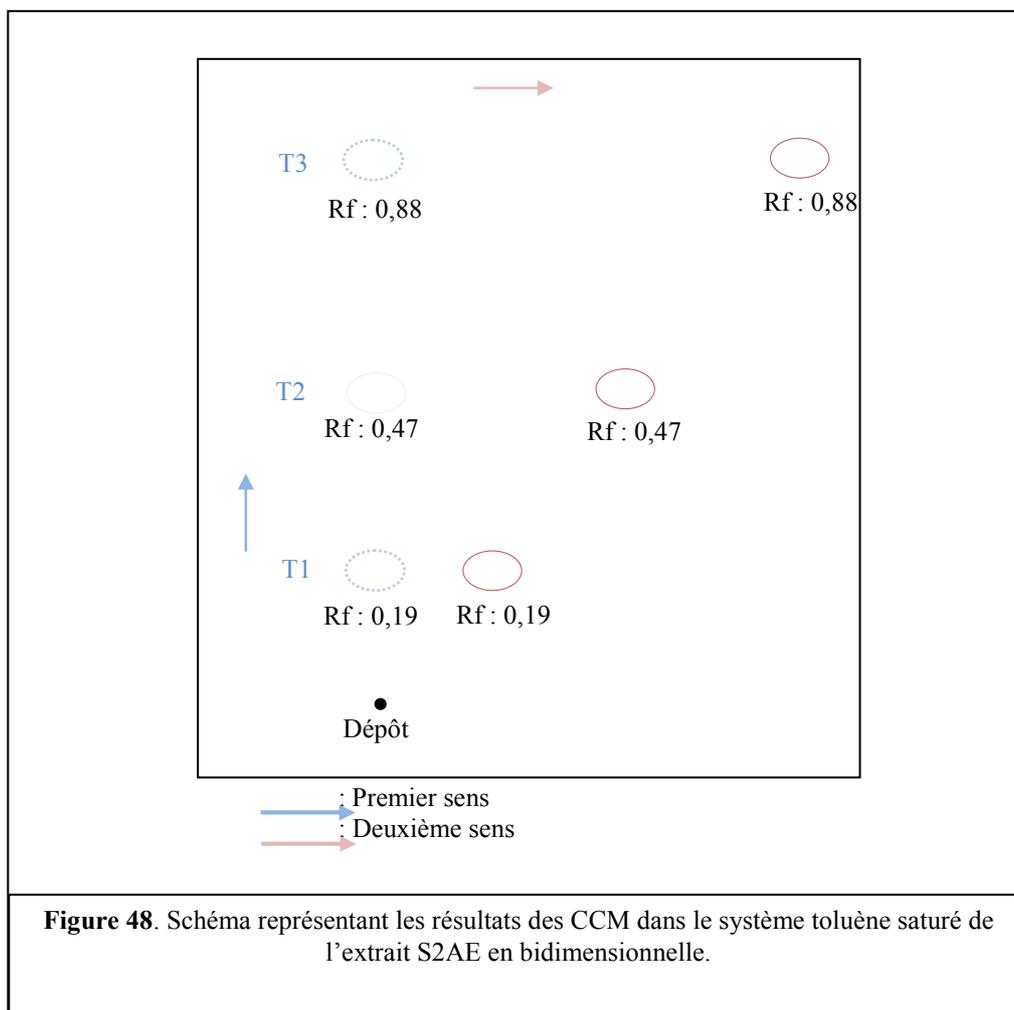


Figure 47. Profil chromatographique de la fraction F1 après détection par absorbance en UV à 3 longueurs d'ondes (logiciel 1100 de Agilent).

2- Souche S2

2-1- CCM analytique

La CCM, en première dimension, de l'extrait S2AE réalisée avec le système toluène saturé, donne trois taches T1, T2 et T3 dont les Rfs, respectifs, sont 0,19 ; 0,47 et 0,88. En deuxième dimension, chaque tache parcourt la même distance que pendant la première migration (**Figure 48**), ce qui démontre la pureté des taches obtenues et confirme les résultats de la CCM réalisée dans la partie « étude préliminaire des activités antibactériennes » avec le même système solvant. Les deux taches actives T1 et T3, dont les résultats de l'absorbance en UV à différentes longueurs d'onde sont présentés respectivement dans les **figures 49** et **50**, sont prises en considération. Ces dernières montrent deux différents pics d'absorbances en UV pour les deux fractions : 223,4nm et 272,8nm pour la fraction T3 et 200nm et 275nm pour la fraction T1. Ce qui suppose la présence de molécules différentes dans les deux cas.



Spectrum 1: Position: X= 15,0mm Y= 30,0 mm

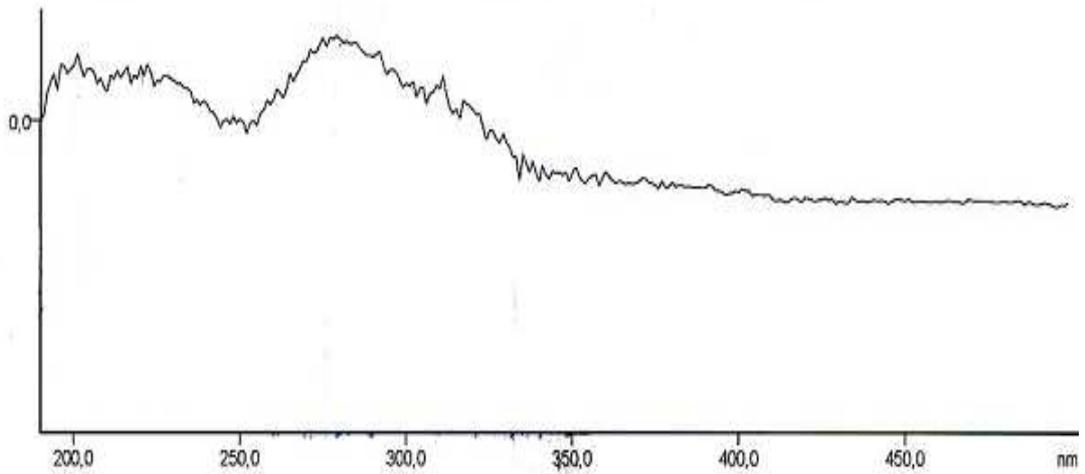


Figure 49. Spectre UV de la fraction T1 donné par le densitomètre (logiciel Desaga Proquant 5).

Spectrum 2: Position: X= 40,0mm Y= 71,1 mm

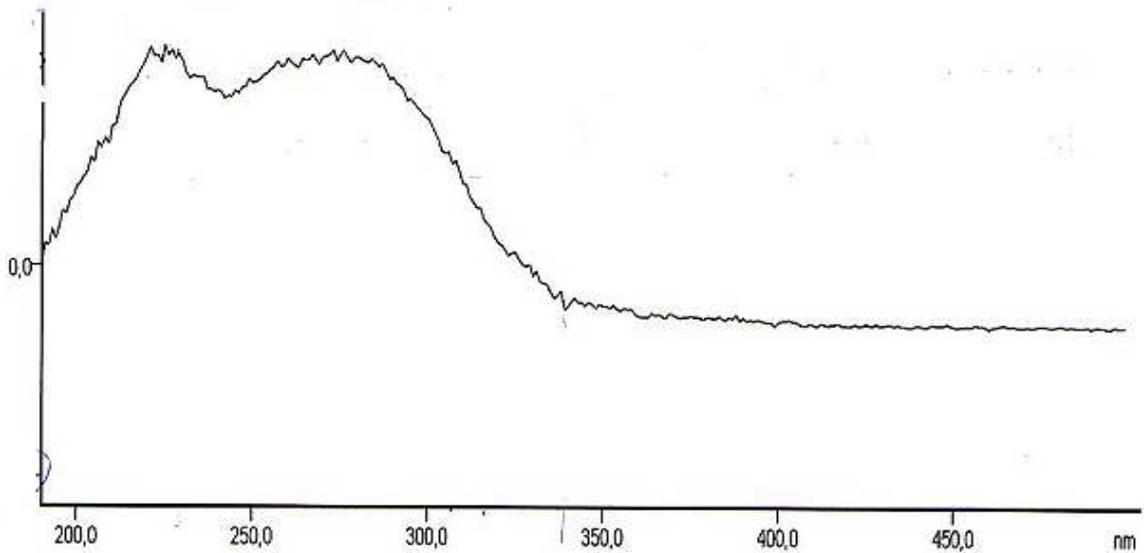


Figure 50. Spectre UV de la fraction T3 donné par le densitomètre (logiciel Desaga Proquant 5).

2-2- CCM préparative

Après récupération des trois taches T1, T2 et T3 et mesure de leurs masses respectives, nous constatons que les fractions T2 et T3 sont présentes dans l'extrait S2AE à des proportions égales : 27,32% (P/P) chacune alors que la fraction T1 ne représente que 10,93% (P/P) de l'extrait brut. Les deux fractions T1 et T3 présentent des activités antibactériennes contre *B. cereus* et *S. faecalis* (**Tableau 21**).

L'activité de la fraction T1 représente plus de 50% de l'activité antibactérienne de l'extrait brut (53,8% contre *S. faecalis* et 60% contre *B. cereus* et une moyenne de 56,9%), alors que la fraction T3 représente plus de 60% de l'activité antibactérienne (60% contre *B. cereus* et 69% contre *S. faecalis* avec une moyenne de 64,5%).

Considérant le rapport entre le pourcentage en poids et le pourcentage en activité des deux fractions, la fraction T1 semble être plus performante en activité que la fraction T3.

Tableau 21. Activité antibactérienne des trois fractions de l'extrait S2AE.

Diamètre d'inhibition en mm contre :							
<i>B.cereus</i>				<i>S.faecalis</i>			
Extrait brut (100%)	T1 (10,93%)	T2 (27,32%)	T3 (27,32%)	Extrait brut (100%)	T1 (10,93%)	T2 (27,32%)	T3 (27,32%)
10	06	00	06	13	07	00	09

2-3- Étude de l'effet synergique de l'activité antibactérienne des fractions T1, T2 et T3

Les trois fractions (T1, T2 et T3) réunies et les deux fractions actives (T1 et T3) réunies, donnent des zones d'inhibition proches de celle obtenue avec une seule fraction (essentiellement la fraction T3) (**Tableau 22**), ce qui signifie l'absence d'effet synergique entre les trois fractions et mêmes entre les deux fractions actives. La différence de l'activité de l'extrait brut (10 à 13 mm) et celle des deux fractions actives (6 à 9 mm) peut être expliquée par une perte d'une quantité des molécules bioactives pendant les différentes étapes de purification (migration, récupération de taches, filtration...etc.).

Tableau 22. Activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait S2AE réunies.

Diamètre d'inhibition en mm contre :					
<i>B.cereus</i>			<i>S.faecalis</i>		
Extrait brut	T1, T2, T3	T1, T3	Extrait brut	T1, T2, T3	T1, T3
10	06	06	13	09	09

2-4- Purification par HPLC

2-4-1- HPLC analytique

Les résultats de la chromatographie à haute performance de l'extrait brut, de la fraction T1 et de la fraction T3 sont présentés dans les **figures 51, 52 et 53** respectivement. Il apparaît dans l'extrait brut un très grand nombre de molécules absorbant aux deux longueurs d'ondes d'UV (254 et 280nm), la fraction majoritaire ici est celle à temps d'éluion 42,41mn. La fraction T1 (**Figure 52**), montre par contre un petit nombre de pics, le pic majoritaire est celui à temps d'éluion 42,6mn, il correspond probablement à la molécule active, ce qui va être confirmé en testant son activité antibactérienne après HPLC préparative.

La fraction T3 donne après passage en HPLC plus de pics que la fraction T1, le pic à temps d'éluion 38,51mn (aux deux longueurs d'ondes 254 et 280nm) représente le pic majoritaire (**Figure 53**), son activité antibactérienne doit être testée après HPLC préparative pour confirmer qu'il correspond à la molécule active recherchée. Enfin, il est important de signaler que les pics à temps 42,6mn de la fraction T1 et à temps 38,5mn de la fraction T3 apparaissent dans le chromatogramme de l'extrait brut à des quantités importantes.

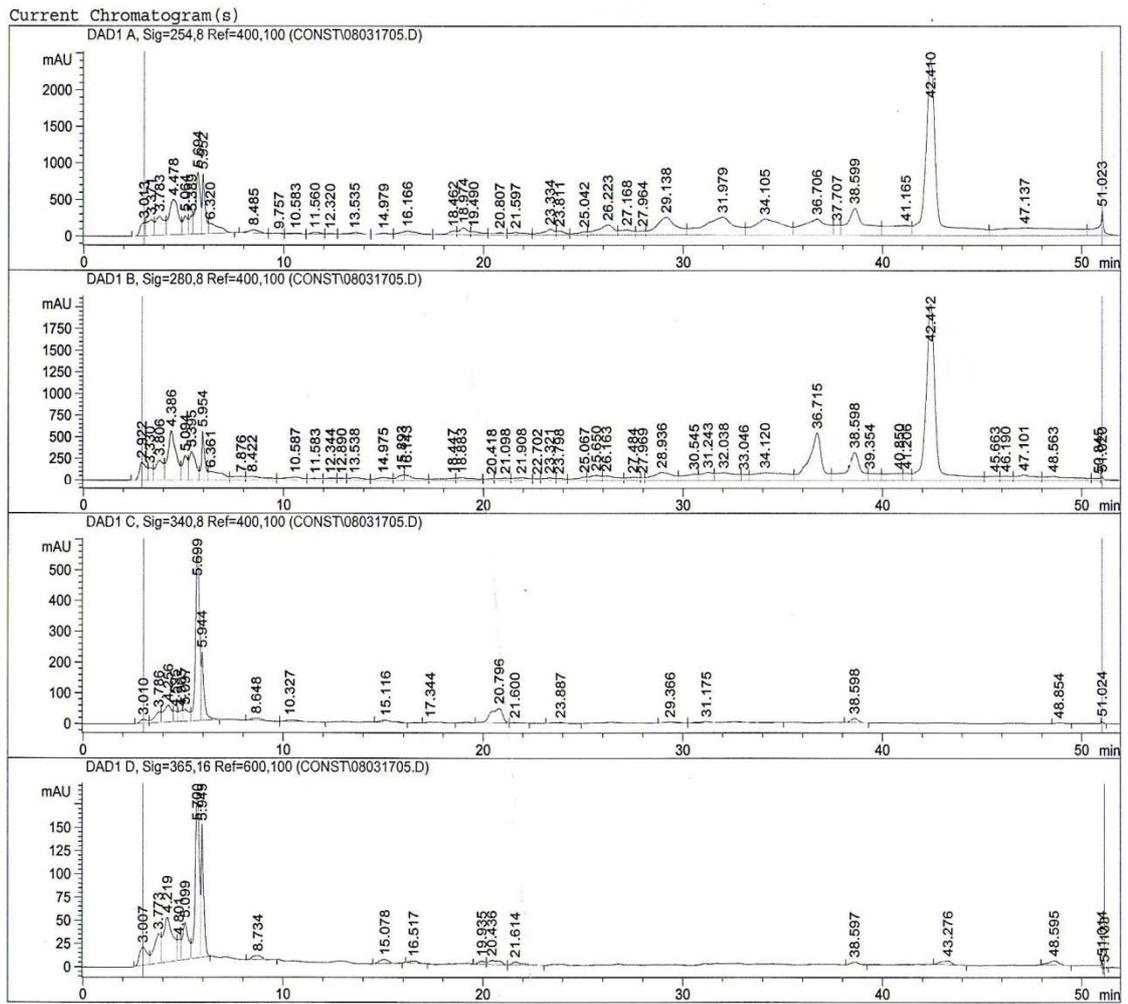


Figure 51. Profil chromatographique de l'extrait brut S2AE après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes (logiciel 1100 de Agilent).

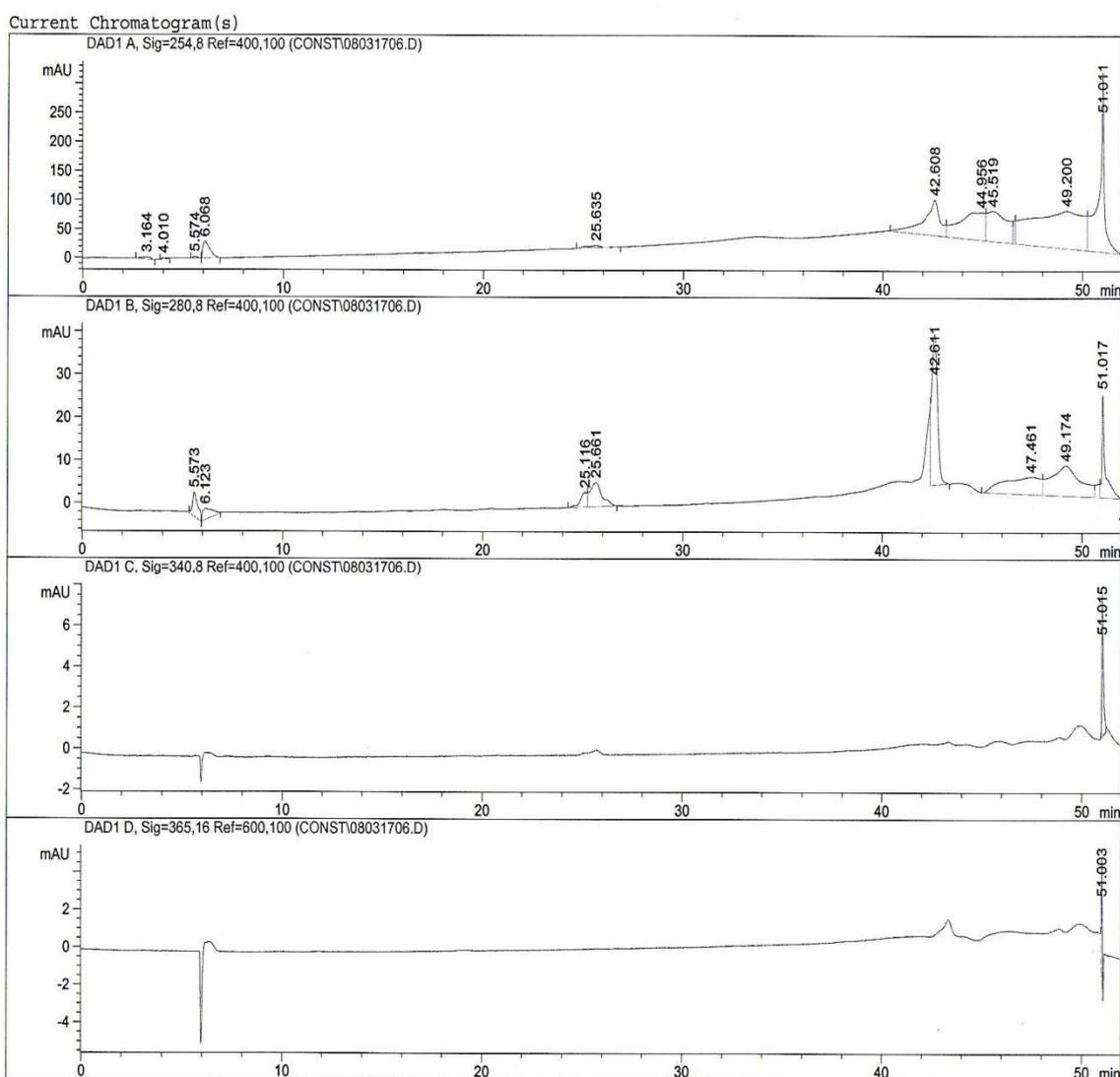


Figure 52. Profil chromatographique de la fraction T1 après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes (logiciel 1100 de Agilent).

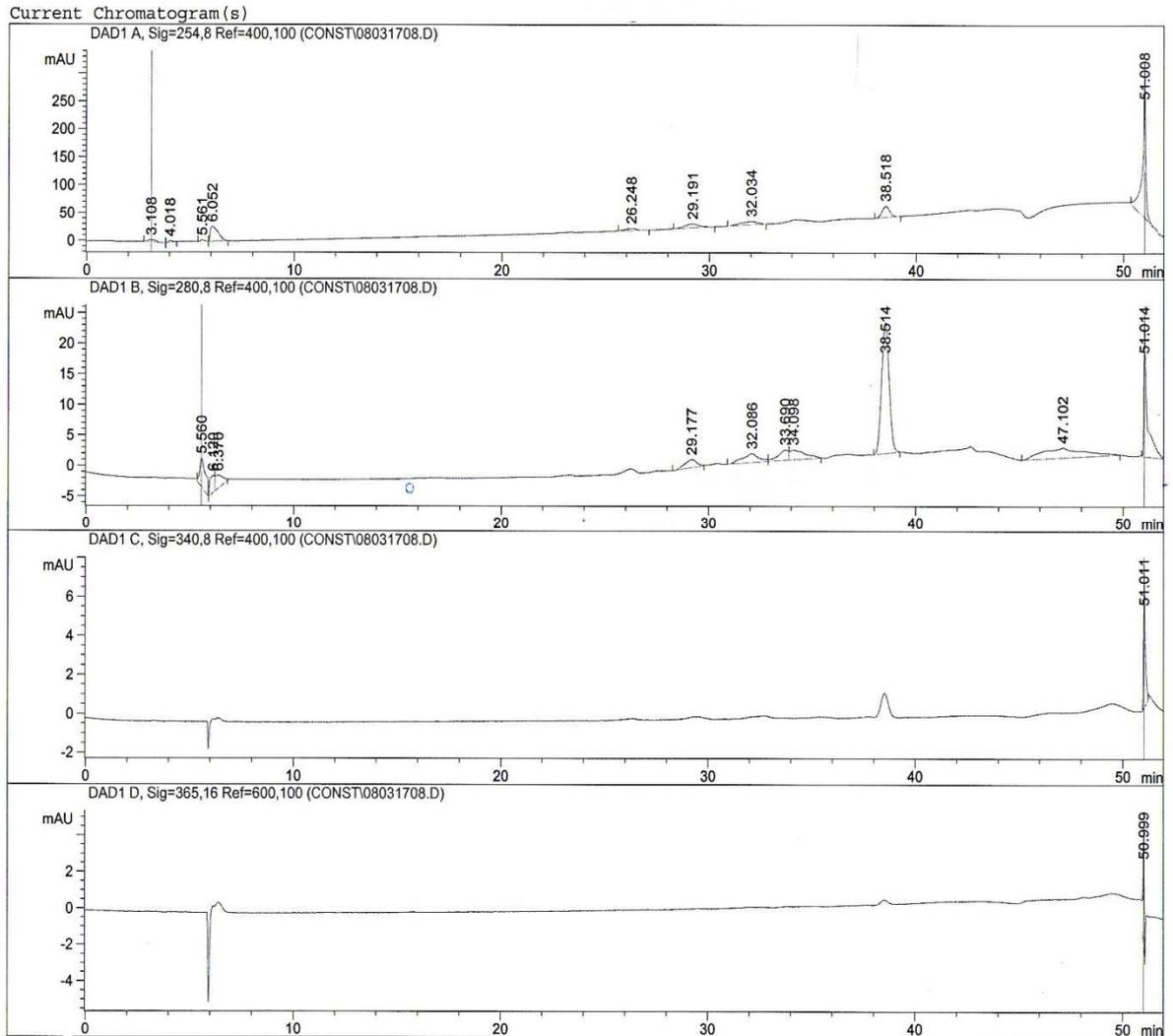


Figure 53. Profil chromatographique de la fraction T3 après détection par absorbance en UV à 4 longueurs d'ondes (logiciel 1100 de Agilent).

2-4-2- HPLC préparative

A partir des deux fractions T1 et T3 de l'extrait S2AE, plusieurs collectes ont été récupérées :

Fraction T1 : T1a : de 0 à 20 mn,
T1b : de 20 à 40 mn,
T1c : de 40 à 44 mn,
T1d : de 44 à 50 mn,
T1e : de 50 à 52 mn.

Fraction T3 : T30 : de 0 à 28mn,
T3a : de 28 à 31mn,
T3b : de 31 à 33mn,
T3c : de 33 à 39 mn,
T3d : de 39 à 50 mn,
T3e : de 50 à 52 mn.

Le test d'activité antibactérienne de la totalité des fractions collectées montre que seules les deux fractions T1c et T3c possèdent des activités antibactériennes contre *S. faecalis* (**Tableau 23**), ces deux dernières sont donc récupérées, concentrées et séchées après plusieurs tours d'HPLC pour être identifiées dans les prochaines étapes de travail.

Tableau 23. Activité antibactérienne des différentes collectes d'HPLC de l'extrait S2AE.

Diamètre d'inhibition en mm contre <i>S. faecalis</i> :											
Fraction T1						Fraction T3					
T1	T1a	T1b	T1c	T1d	T1e	T3	T3a	T3b	T3c	T3d	T3e
07	00	00	07	00	00	09	00	00	09	00	00

Analyse structurale des molécules antibactériennes

L'analyse de la structure des molécules antibactériennes, de la fraction F1a de la souche S1 et des fractions T1c et T3c de la souche S2 obtenus à partir des extraits purifiés, a été effectuée par différentes techniques: absorbance en UV, absorbance en IR et spectrométrie de masse. Le travail exposé dans ce chapitre constitue le criblage tertiaire dans la stratégie de recherche de nouveaux antibiotiques. Ainsi, notre objectif essentiel est d'aboutir à identifier nos molécules antibactériennes et conclure s'il s'agit de nouvelles molécules ou non. Les caractéristiques structurales de nos molécules déterminées, essentiellement, par des méthodes spectroscopiques seront comparées à celles des molécules figurant dans la banque des données (dictionnaire des antibiotiques).

Matériel et méthodes

1- Étude de l'absorbance UV-Visible à différentes longueurs d'ondes

L'absorbance UV-Visible des trois fractions purifiées F1a, T1c et T3c est réalisée en balayant différents longueurs d'ondes et ceci en faisant appel à une HPLC couplée à un spectrophotomètre UV-Visible. L'HPLC est réalisée dans les mêmes conditions citées dans le chapitre 4. Après injection de l'échantillon, son positionnement sur le chromatogramme d'HPLC est repéré et la courbe d'absorbance UV-visible est tracée directement par le logiciel « Agilent 1100 ».

2- Étude de l'absorbance IR à différentes longueurs d'ondes

L'absorbance en IR des trois fractions actives pures est réalisées en utilisant un spectrophotomètre IR à transformé de Fourier de marque « Shimadzu FTIR -82015». Avant d'être introduits dans l'appareil, chaque fraction (F1a, T1c T3c) est broyée avec 100 mg de bromure de potassium (KBr), afin d'obtenir des particules de taille inférieure à 2 microns, ces dernières sont compressées à 10000-15000 psi (10 tonnes) sous forme de pastille. Les pastilles ainsi préparées sont introduites dans le spectrophotomètre IR à transformé de Fourier. Les résultats sont enregistrés et la variation du pourcentage de transmittance en fonction des différentes longueurs d'ondes d'IR est donnée par le logiciel « Hyper 110 ».

3- Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse des différentes fractions est réalisée en utilisant l'HPLC couplée à un spectromètre de masse. L'HPLC réalisée dans les mêmes conditions citées dans le chapitre précédent, est reliée à un spectromètre de masse APCI. L'APCI est une technique d'ionisation qui fait appel à des réactions ions-molécules en phase gazeuse à pression atmosphérique. C'est une technique analogue à l'ionisation chimique où les ions primaires sont produits par des décharges Corona sur un aérosol de solvant.

L'éluât chromatographique est directement introduit dans un nébuliseur pneumatique où il est converti en un fin brouillard à l'aide d'un jet d'azote à haute vitesse. Les gouttelettes sont alors déplacées par le flux gazeux au travers d'un tube de quartz chauffé, appelé chambre de désolvatation / vaporisation. La chaleur transférée aux gouttelettes de l'aérosol va permettre la vaporisation de la phase mobile et de l'échantillon dans le courant de gaz. Le gaz chaud (120 °C) et les substances sortent de ce tube pour arriver dans la région de transfert de la source se trouvant à pression atmosphérique où ils sont ionisés chimiquement par le transfert de protons en mode positif et le transfert d'électrons en mode négatif. La phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz ionisant en produisant des ions quasi-moléculaires. Les résultats sont enfin enregistrés et le spectre de masse de chaque fraction est tracé par le logiciel « Agilent 1100 ».

Résultats et discussion

1- Fraction F1a de la souche S1

1-1- Étude de l'absorbance UV-Visible à différents longueurs d'ondes

Le spectre UV-Visible de la fraction F1a de la souche S1, présenté dans la **figure 54** montre un maximum d'absorption à 238 nm avec un épaulement à 268nm (dans l'UV proche). Une absorbance maximale à ces deux longueurs d'onde suppose la présence d'un noyau aromatique ou de groupements conjugués. La longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) augmente au fur et à mesure que le nombre de doubles liaisons augmente. Quand ce nombre devient plus grand que 5, l'accroissement de λ_{max} devient moins rapide. Plusieurs travaux ont montré que les molécules antibiotiques synthétisées par des *Streptomyces* possèdent un maximum d'absorption en UV à des longueurs d'onde situés entre 215 et 270 nm (Ilic *et al.*, 2005 ; Saisivam *et al.*, 2008 ; Atta, 2009).

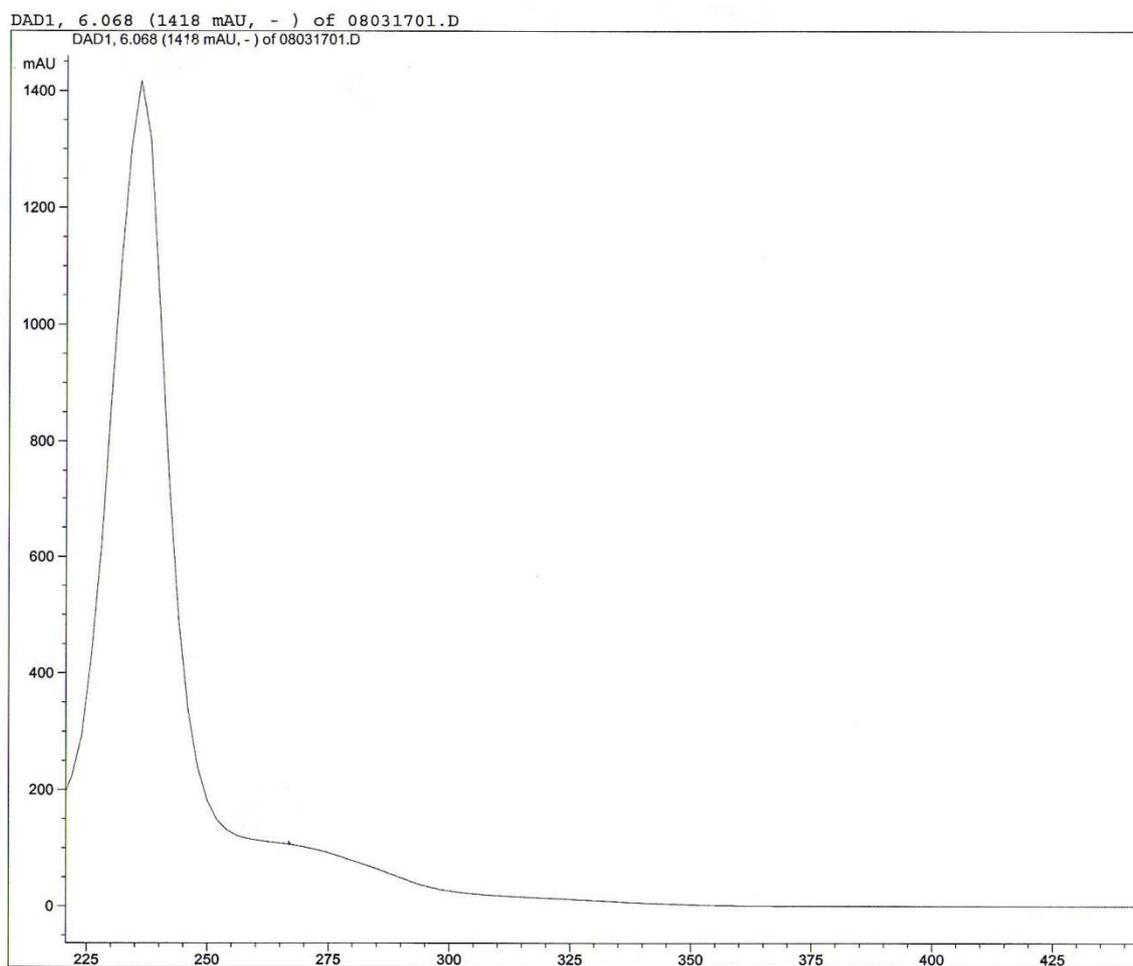


Figure 54. Spectre UV-Visible de la fraction F1a (logiciel Agilent 1100).

1-2- Analyse du spectre IR

Les deux domaines importants dans l'examen préliminaire d'un spectre IR sont les régions comprises entre 4000 et 1300 cm^{-1} et entre 900 et 650 cm^{-1} . Les fréquences d'élongations caractéristiques des groupements fonctionnels importants (Tels que OH, NH et CO) se situent dans ces portions du spectre (région des groupements fonctionnels) (**Silverstein *et al.*, 2007**). Le spectre de la fraction F1a montre la présence d'une bande intense à 1461,9 cm^{-1} correspondant à une élongation C=C et une autre moins intense à 1380,9 cm^{-1} indiquant une structure aromatique ou hétéro aromatique. Cette dernière est confirmée par la forte bande à 744,5 cm^{-1} (**Figure 55**).

L'élongation CH aliphatique apparaît dans les bandes 2927,7 et 2862,2 cm^{-1} . Les bandes 3444,6 cm^{-1} , 2615,3 (bande faible) indiquent la présence d'OH liés ou NH alors que les bandes 1643,2 cm^{-1} et 1732,0 cm^{-1} indiquent des groupements SH et de carbonyles respectivement. Enfin la bande intense à 1076,2 cm^{-1} peut être attribuée à un OH comme elle peut être attribuée à un S=O (**Figure 55**).

1-3- Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de la fraction F1a, obtenu en APCI en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ de rapport m/z égal à 574,2 uma (unité de masse atomique) suggérant une masse moléculaire de 573,2. Le spectre de masse de cet ion présente un fragment majoritaire à m/z 271 (perte de masse de 303). Les autres pics importants correspondent à des fragments ionisés de la molécule comme l'ion à m/z 516 (perte de 58) et l'ion à m/z 456 (perte de 118) (**Figure 56**).

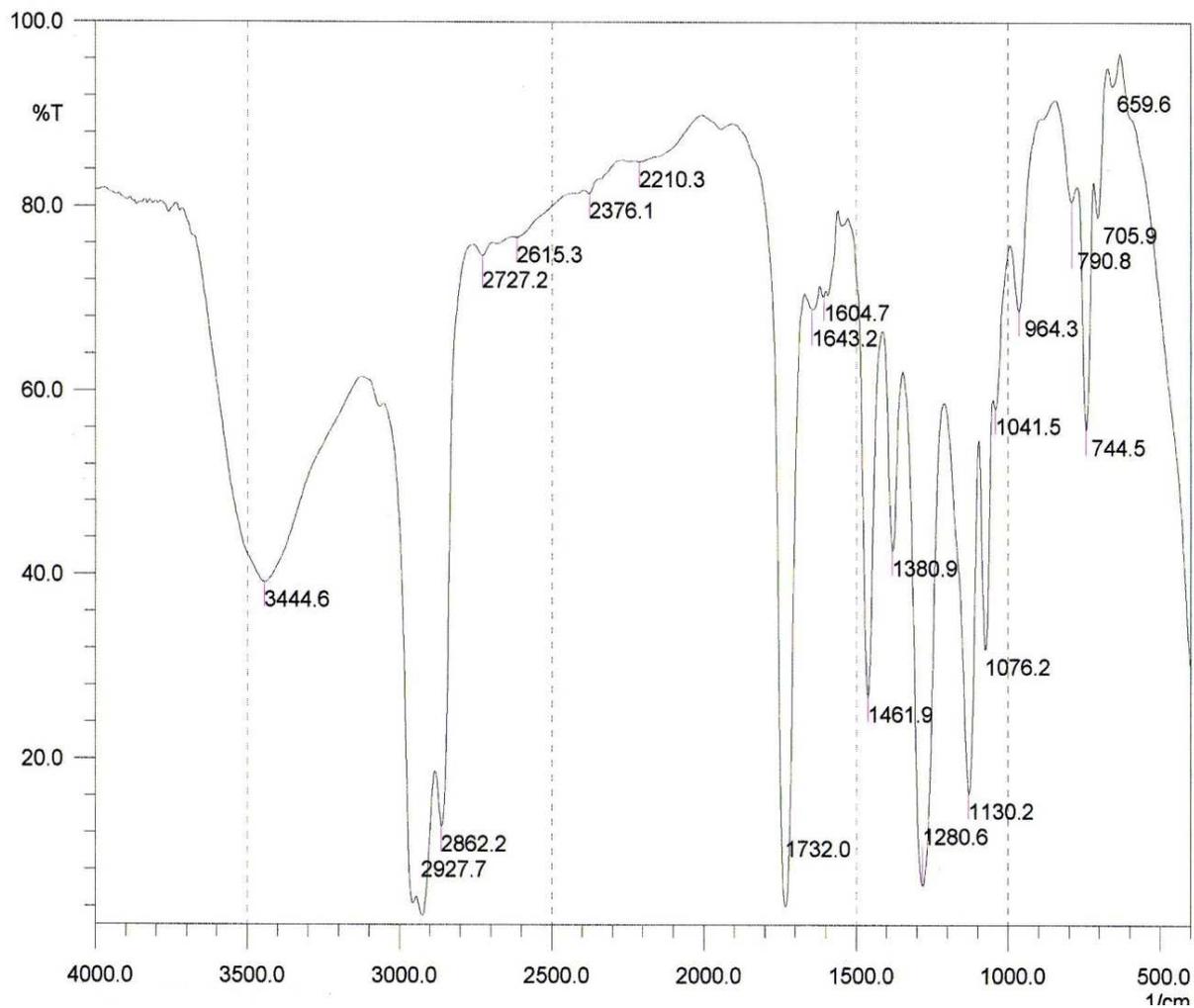


Figure 55. Spectre IR de la fraction F1a (logiciel Hyper 110).

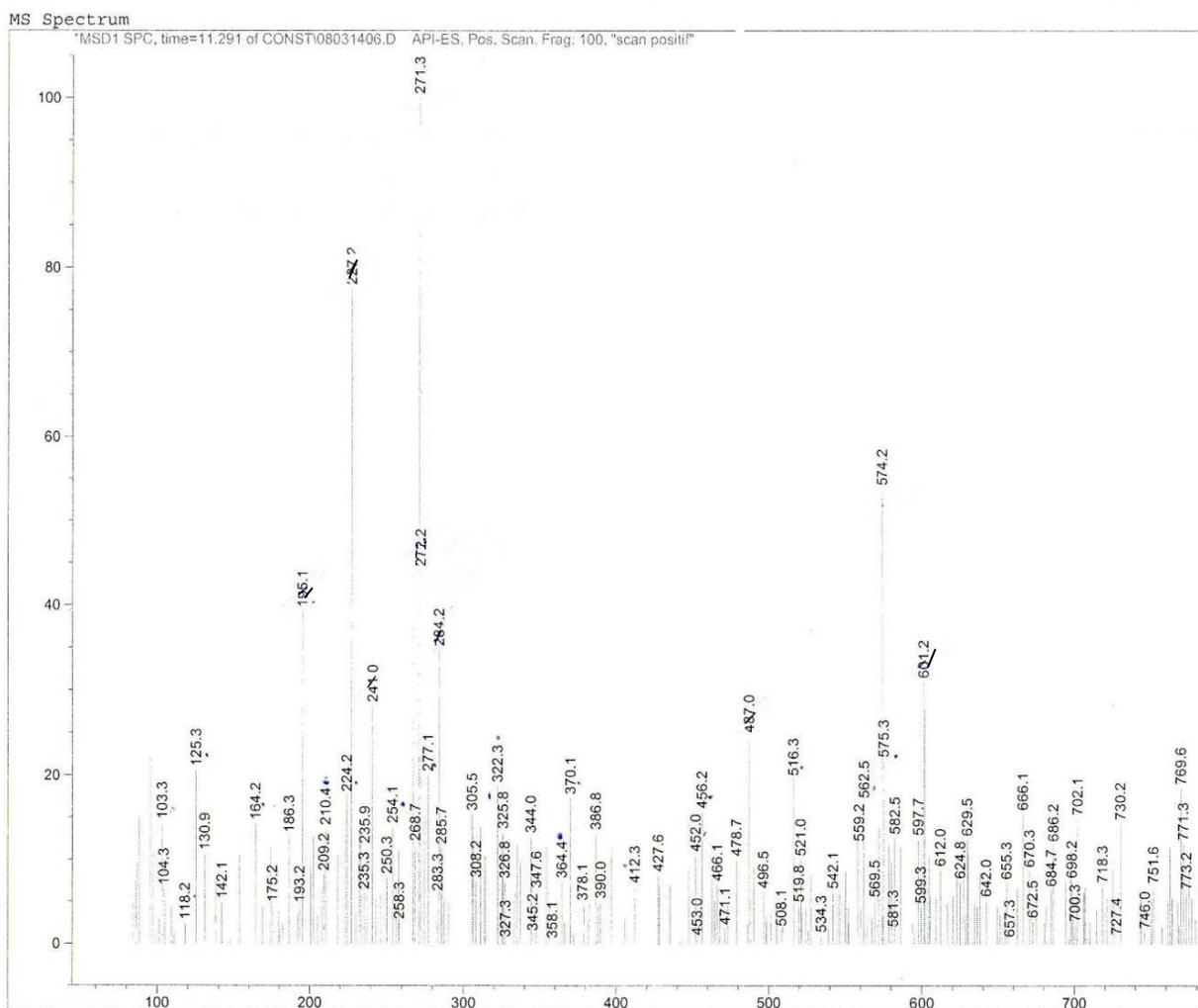


Figure 56. Spectre de masse de la fraction (F1a) enregistré en APCI en mode positif (logiciel Agilent 1100).

1-4- Essai d'identification des molécules antibactériennes de la fraction F1a

La molécule biactive contenue dans la fraction F1a, produite par la souche S1 sur milieu AF solide et extraite par de l'acétate d'éthyle présente une forte activité contre les bactéries multi-résistantes à coloration de Gram positive. Elle est thermorésistante (active même après chauffage à 100°C) et résiste à l'exposition à la lumière, elle est synthétisée au début de la culture et présente un caractère polaire selon les résultats des chromatographies. Notre molécule antibactérienne possède une structure aromatique avec une chaîne aliphatique et porte des groupements hydroxyle, carbonyle, C=C et éventuellement S=O et/ou SH. Sa masse moléculaire est de 573,2 uma.

Le dictionnaire des antibiotiques (**Bycroft et al., 1988**) résume les masses moléculaires et caractéristiques physico-chimiques de tous les antibiotiques connus. Ainsi, l'antibiotique synthétisé par les *Streptomyces* et dont la masse et les propriétés sont les plus proches de celles de notre molécule de la fraction F1a est l'**oganomycine GF**. C'est une céphalosporine de formule brute $C_{18}H_{20}N_4O_9S_4$ (**Figure 57**). Elle est incolore, amorphe, soluble et stable dans de l'acétate d'éthyle, présente une forte activité contre les bactéries à Gram positif, possède un maximum d'absorption en UV à 278 nm et donne une réaction de ninhydrine négative (**Osono et al., 1980**). Ce même type de réaction a été démontré pour notre molécule en employant le réactif de ninhydrine sur CCM. Comme pour notre molécule elle possède une structure aromatique avec une chaîne aliphatique et porte des groupements hydroxyle, carbonyle, C=C et SH. En plus, le milieu de production de notre substance (milieu AF) renferme des substrats complexes (extrait de levure et extrait de malt) contenant entre autres, des aminoacides soufrés qui peuvent constituer une source de soufre servant à la synthèse de cet antibiotique.

Cependant, ces constatations ne sont qu'approximatives et doivent être vérifiées en employant d'autres techniques d'identification spectrométriques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN du proton et du carbone 13) qui étudie l'évolution d'un système de spins propre à chaque noyau soumis à un champ magnétique (**Silverstein et al., 2007**). Cette technique sera complémentaire des résultats déjà obtenus et peut aider dans la détermination de la structure, sachant que l'origine de la molécule (la souche productrice), active sur des bactéries multi-résistantes, correspond probablement à une nouvelle souche ce qui complique l'identification de ces molécules bioactives (qui peuvent être nouvelles).

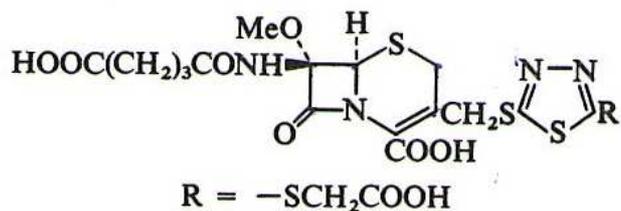


Figure 57. Structure de l'oganomycine GF.

2- Fractions de la souche S2

2-1- Étude de l'absorbance UV-Visible à différents longueurs d'ondes

Les spectres d'absorption en UV-Visible des molécules bioactives de la souche S2 montrent un maximum d'absorption à 234 nm pour la fraction T1c et à 232 nm pour la fraction T3c (**Figures 58 et 59**), les deux molécules de ces deux fractions possèdent donc un noyau aromatique ou des groupements conjugués. Par ailleurs, les deux maximums d'absorption supposent qu'il s'agit de molécules proches dans les deux fractions.

2-2- Analyse des spectres IR

En se basant sur leurs spectres IR (**Figures 60 et 61**), et selon **Silverstein *et al.*, (2007)**, les deux fractions T1c et T3c semblent présenter des structures aromatiques ou hétéro aromatique et aliphatique avec les bandes :

- à 1461,9 cm⁻¹ et 1458,1 cm⁻¹ respectivement pour la fraction T1c et la fraction T3c (élongation C=C),

- à 736,8 cm⁻¹ et à 806,2 cm⁻¹ respectivement pour la fraction T1c et la fraction T3c (structure aromatique due à une déformation du cycle),

- à 2923,9 cm⁻¹ et 2858,3 cm⁻¹ respectivement pour les deux fractions (élongations CH aliphatiques).

Par ailleurs, les bandes :

- à $1732,0\text{ cm}^{-1}$ pour les deux fractions (plus intense dans le cas de la fraction T1c) et à $1643,2\text{ cm}^{-1}$ de la fraction T1c et à $1639,4\text{ cm}^{-1}$ de la fraction T3c correspondent à des élongations C=O,

- à $3433,1\text{ cm}^{-1}$ de la fraction T1c et à $3425,3\text{ cm}^{-1}$ de la fraction T3c (bande large), ce qui dénote la présence d'OH lié ou de NH,

- et, enfin, à $1072,3\text{ cm}^{-1}$ de la fraction T1c et à $1029,9\text{ cm}^{-1}$ de la fraction T3c ce qui nous permet de suspecter la présence de groupement S=O.

Les deux fractions présentent des bandes d'absorption caractéristiques très proches. Cependant des différences d'empreintes situées entre 1400 et 500 cm^{-1} sont très claires.

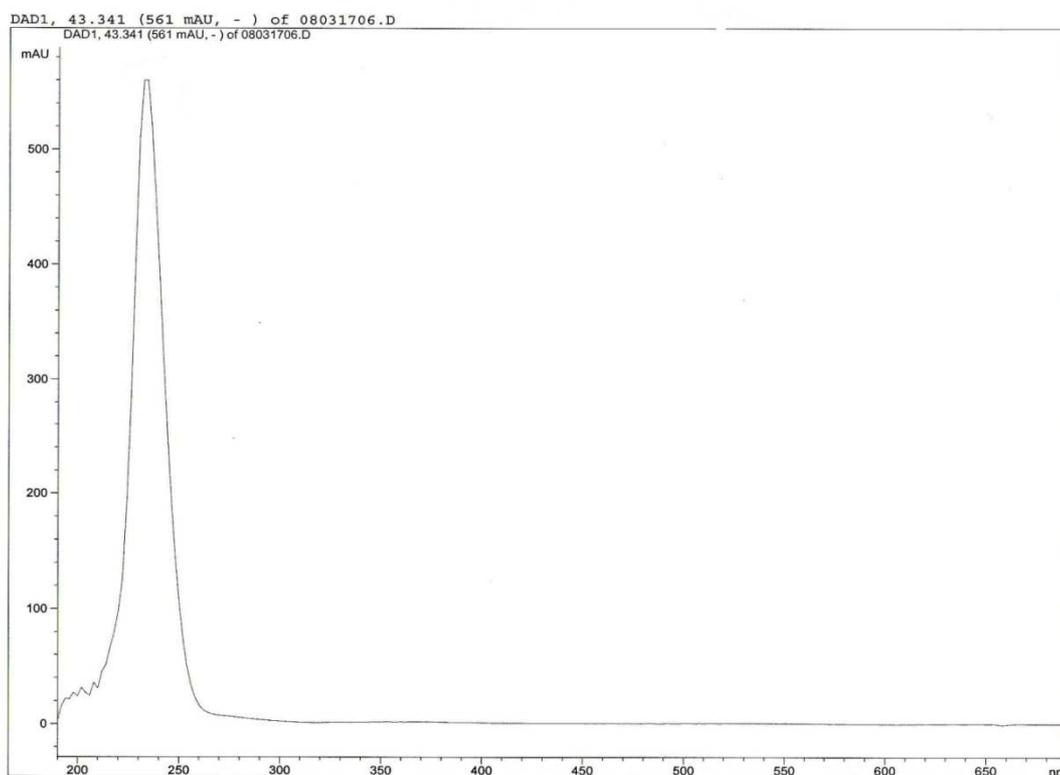


Figure 58. Spectre UV-Visible de la fraction T1c (logiciel Agilent 1100).

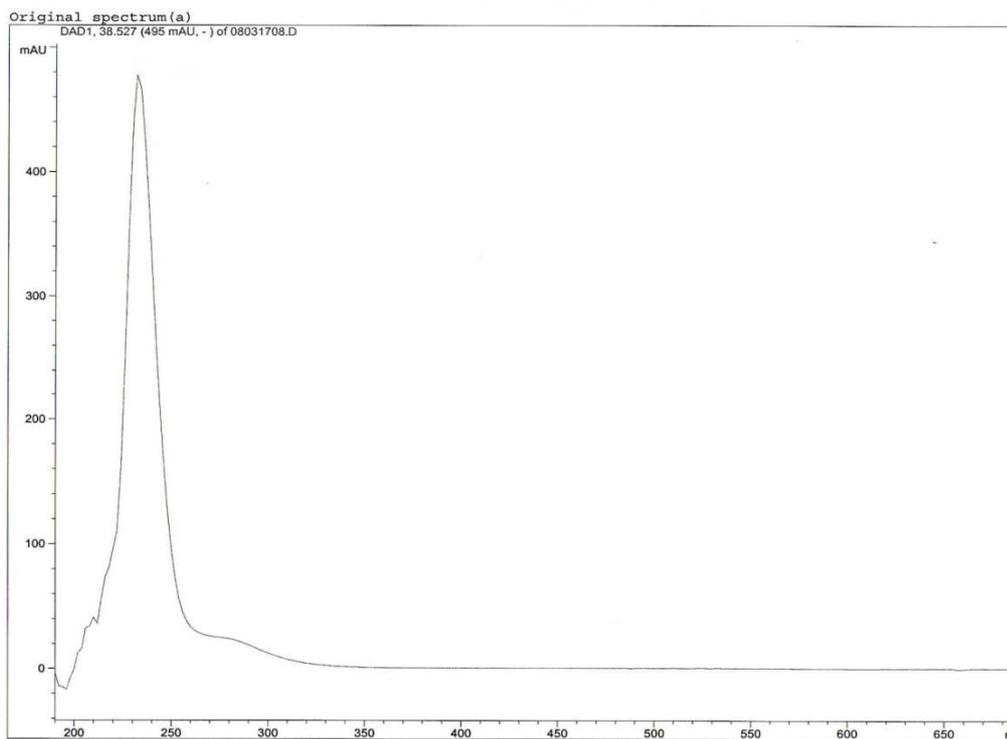


Figure 59. Spectre UV-Visible de la fraction T3c (logiciel Agilent 1100).

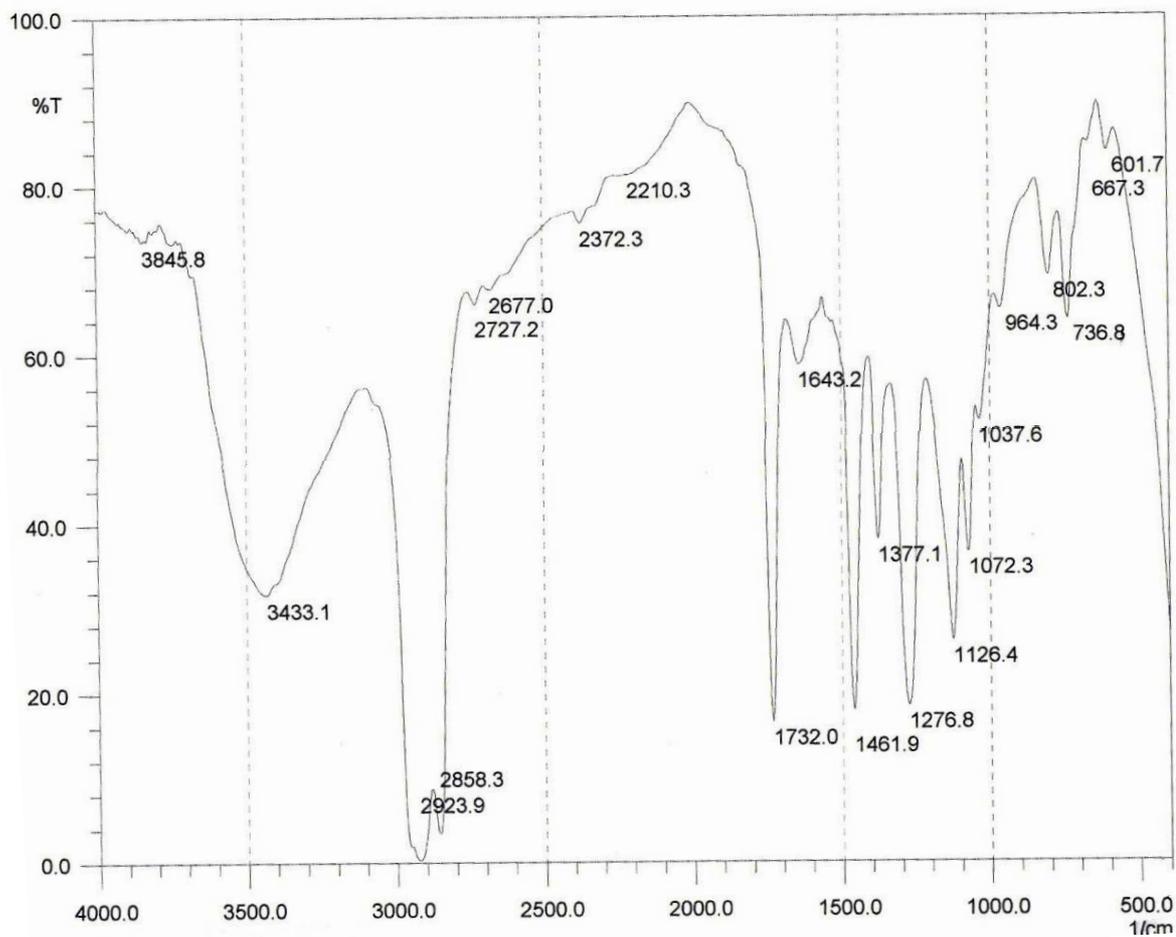


Figure 60. Spectre IR de la fraction T1c (logiciel Hyper 110).

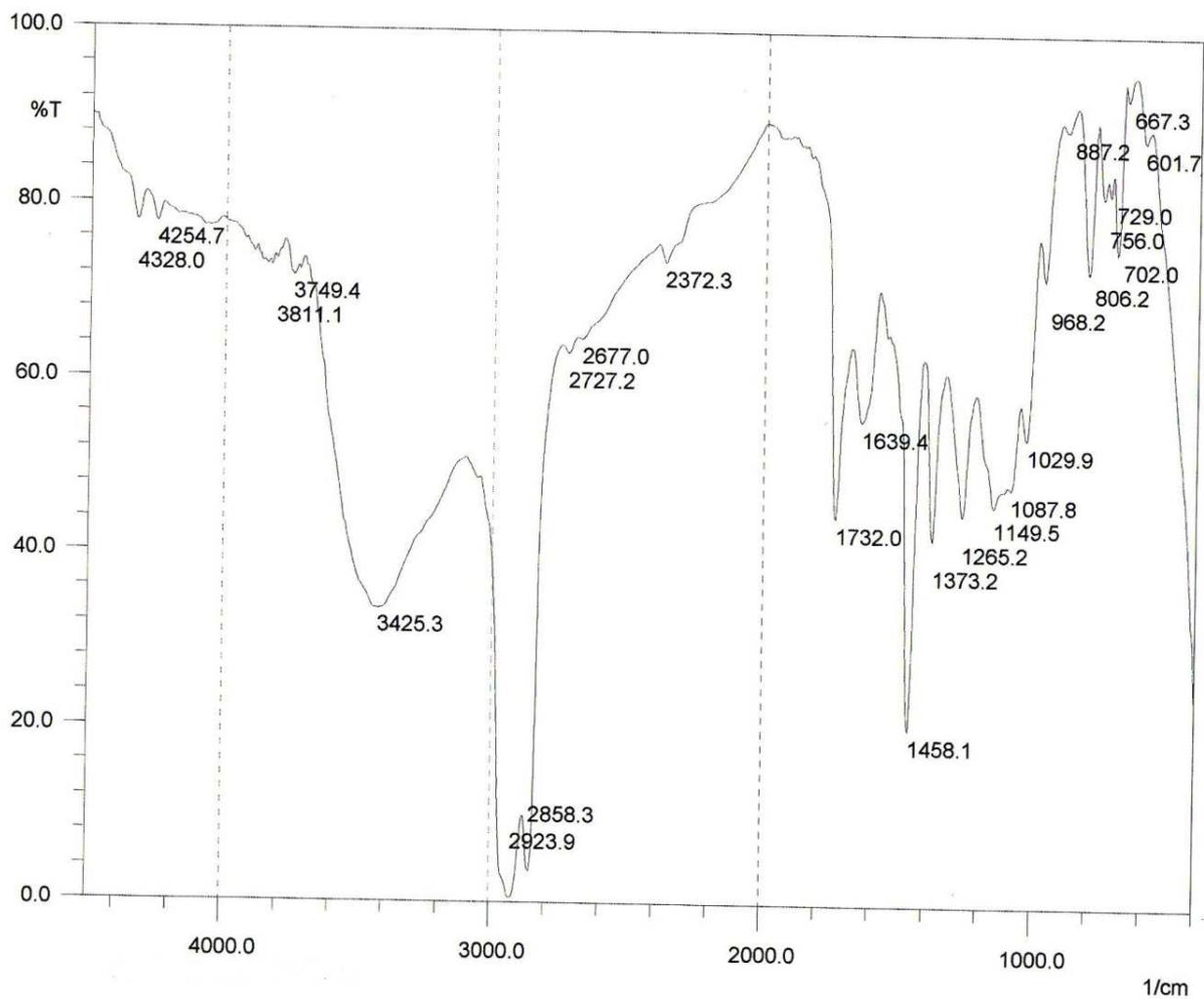


Figure 61. Spectre IR de la fraction T3c (logiciel Hyper 110).

2-3- Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de la fraction T1c, obtenu en APCI en mode positif est présenté dans la **figure 62**. L'ion pseudo-moléculaire apparaît avec un rapport m/z de 400,3 $[M+H]^+$ ce qui signifie une masse moléculaire de 399,3. Le spectre de masse présente deux autres ions majoritaires à m/z 299,2 (perte de 100) et à m/z 422 (différence de 23).

Pour la fraction T3c, l'ion moléculaire est de rapport m/z 804,4 $[M+H]^+$ traduisant une masse de 803,4 (**Figure 63**).

2-4- Essai d'identification des molécules bioactives de la souche S2

La souche S2 produit deux molécules antibactériennes différentes contenues dans les fractions T1c et T3c. Toutes les deux ont été produites sur milieu AF solide et extraites par de l'acétate d'éthyle et selon les analyses structurales elles possèdent une structure aromatique avec une chaîne aliphatique et des groupements C=C, hydroxyle, et carbonyle. Cependant, la fraction T1c possède un caractère polaire et une masse molaire de 399 alors que la fraction T3c se comporte comme une molécule apolaire avec un poids moléculaire de 803. En plus, la fraction T1c possède une plus forte activité antibactérienne en comparaison avec la fraction T3c.

Selon le dictionnaire des antibiotiques (**Bycroft et al., 1988**), l'antibiotique dont les caractères sont plus proches de ceux de la fraction T3c est la paulomycine (**Figure 64**), grosse molécule possédant un cycle, des sucres et des chaînes aliphatiques avec des groupements C=C, hydroxyle et carbonyle. Cet antibiotique de formule brute ($C_{34}H_{46}N_2O_{17}S$) produit par *Streptomyces paulus* est actif contre les bactéries à Gram positif. Il est soluble dans le toluène, l'acétate d'éthyle et l'acétone et possède un spectre IR très proche de celui de la fraction T3c à l'exception de la bande 2050 cm^{-1} (correspondant au groupement SCN), en plus il possède entre autre, un maximum d'absorbance en UV à 236nm (**Argoudelis et al., 1982**) (avec un maximum de 232nm pour la fraction T3c).

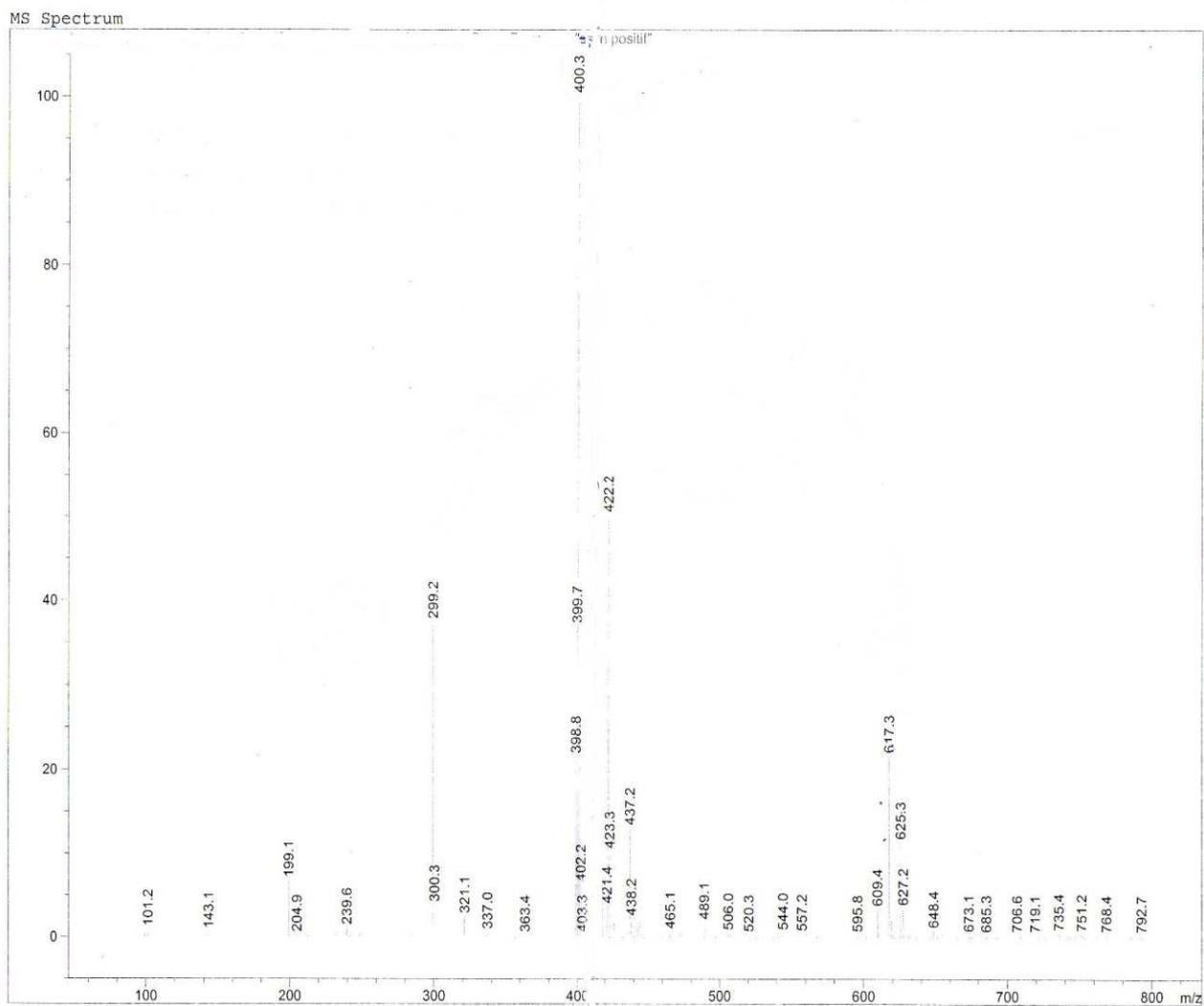


Figure 62. Spectre de masse de la fraction (T1c) enregistré en APCI en mode positif (logiciel Agilent 1100).

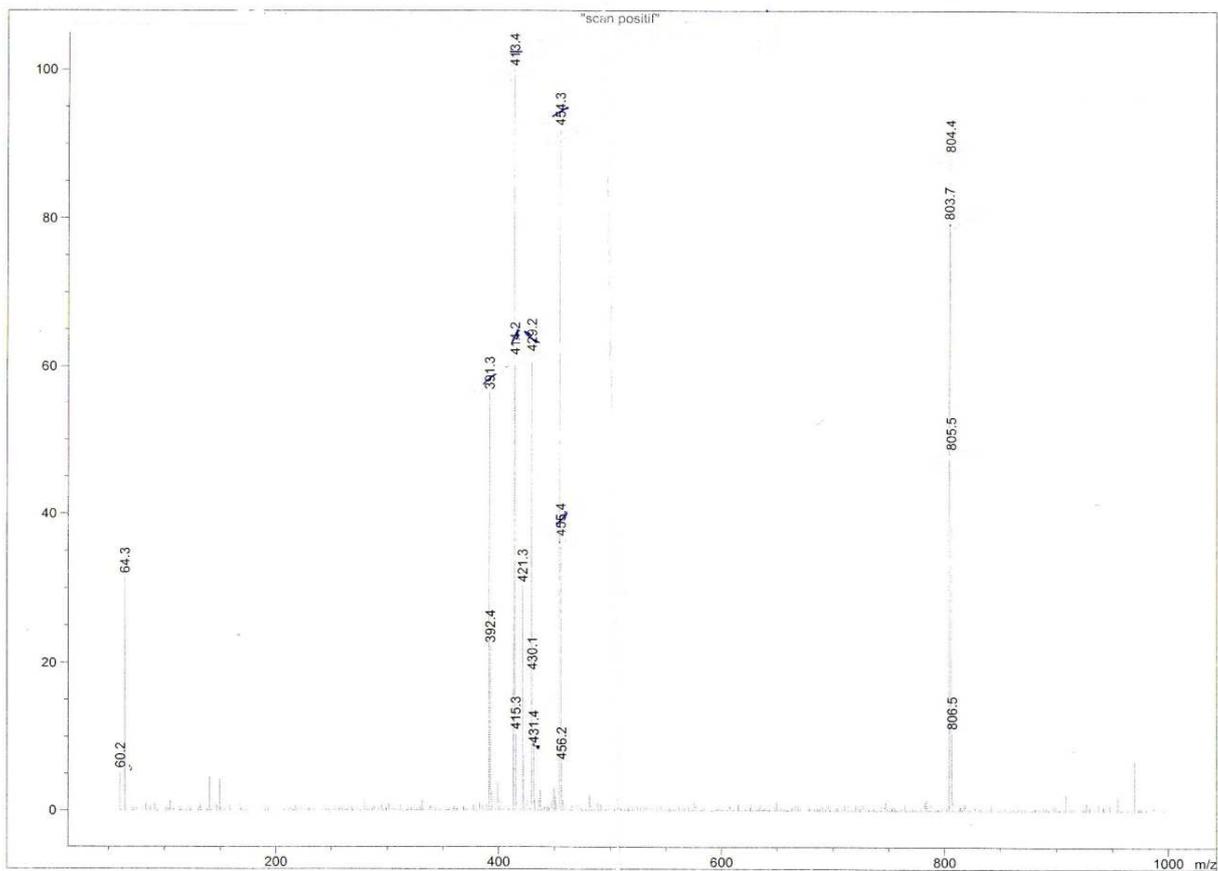


Figure 63. Spectre de masse de la fraction (T3c) enregistré en APCI en mode positif (logiciel Agilent 1100).

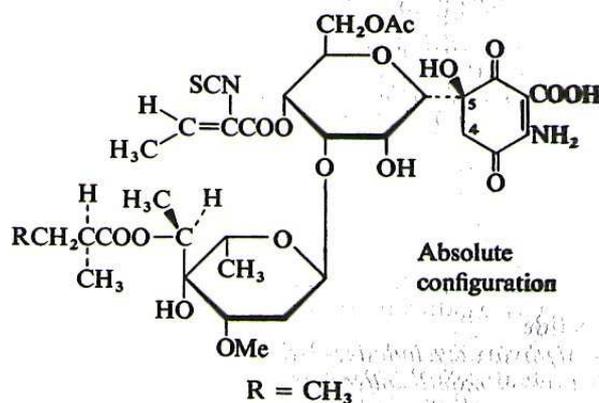


Figure 64. Structure de la paulomycine.

Un autre antibiotique 7- methoxydeacétylcéphalosporine C (**Figure 65**) synthétisé par *Streptomyces chartreusis* et *Streptomyces organonensis* possède des caractères très proches de ceux de la fraction T1c. C'est une céphalosporine active contre les bactéries à Gram positif qui possède un noyau β -lactame avec des chaînes aliphatiques et des groupements C=C, NH, C=O. Sa formule est $C_{15}H_{21}N_3O_8S$. Il est important de signaler que la fraction T1c possède des caractéristiques qui la rapprochent plus de la fraction F1a (que la fraction T3c) comme les spectres IR très proches et la forte activité antibactérienne, en plus, les deux fractions sont polaires et se rapprochent plus aux céphalosporines.

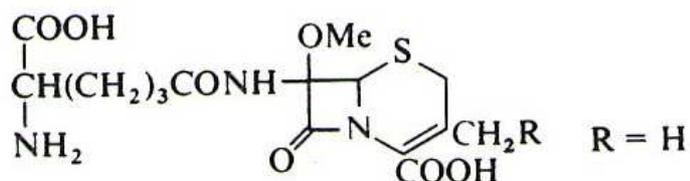


Figure 65. Structure de 7- methoxydeacétylcéphalosporine C.

La souche S2 produit donc deux molécules antibactériennes de structure différente, ceci est fréquemment observé chez les *Streptomyces* puisque selon (**Sanglier et Trujillo, 1997 ; Davelos et al., 2004**), une seule souche peut synthétiser un nombre variables de métabolites appartenant à une ou plusieurs familles chimiques.

Néanmoins, tous ses résultats doivent être vérifiés et complétés en employant la résonance magnétique nucléaire (RMN du proton et du carbone 13) afin de déterminer la structure et de confirmer s'il s'agit ou non d'une nouvelle molécule, vu que la souche productrice correspond probablement à une nouvelle souche.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'une des stratégies suivies dans la recherche de nouvelles molécules antibiotiques consiste à isoler des bactéries actinomycétales à partir d'écosystèmes peu ou pas explorés (Groth *et al.*, 1999 ; Lakshmipathy et Kannabiran, 2009 ; Rajan et Kannabiran, 2010). Ainsi, les Sebkha qui sont des régions rares dans le monde semblent être des environnements promoteurs pour isoler, éventuellement, de nouvelles souches d'actinomycètes pouvant être sources de nouvelles molécules antibiotiques. Les résultats d'identification des souches obtenus dans le premier chapitre confirment cette hypothèse. Il s'est avéré que les deux souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkha ne ressemblent à aucune espèce connue. En effet, les analyses des gènes codant l'ARNr 16S ont montré que *Streptomyces tricolor* NBRC15457 est la plus proche de la souche S1 avec un degré de similitude de 99,92% mais un pourcentage de bootstrap faible et une distance génétique assez importante. En plus, les couleurs des mycéliums aérien et végétatif, la morphologie de la chaîne de spores et l'assimilation de quelques sucres sont différentes. La souche S2 se situe, avec *Streptomyces roseolus* NBRC 12816^T, sur la même ligne phylogénétique avec un haut degré de similitude (98,97%), mais toujours avec un pourcentage de bootstrap faible et une grande distance génétique. Comme pour la souche S1, la souche S2 présente, également, des différences phénotypiques avec *Streptomyces roseolus* NBRC 12816^T. Considérant, l'ensemble des caractéristiques des deux souches notamment leurs gènes codant pour l'ARN16S, nous pouvons conclure que nous sommes, probablement, en présence de **deux nouvelles espèces de *Streptomyces***.

Les souches S1 et S2 montrent des activités antibactériennes contre toutes les souches sensibles et résistantes testées. La souche S1 présente une activité plus importante que celle de la souche S2. Pour les deux souches, les activités antibactériennes sont plus importantes contre les bactéries à Gram positif, différentes d'un milieu de culture à un autre et apparaissent dès le premier jour d'incubation. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) a démontré que les facteurs : souche productrice, milieu, souche-test et les interactions « souche productrice/milieu », « souche productrice/souche-test », « milieu/souche-test » et « souche productrice/milieu/souche-test » sont hautement significatifs sur l'apparition des activités antibactériennes. Par ailleurs, les deux souches présentent, sur certains milieux, de faibles activités antilevurienne et antifongique.

L'étude des molécules bioactives des souches S1 et S2, a été suivie conformément à la **stratégie de screening** développée par **Deshayes *et al.*, (1989)** afin de vérifier s'il s'agit de molécules antibiotiques déjà existantes. Le **criblage primaire** consiste, après culture des souches sur différents milieux solides, à tester *in vitro* les potentialités des souches à produire des molécules antibiotiques. Ces tests ont révélés que les deux souches du genre *Streptomyces* sp. sont douées d'activités antibactérienne et antifongique et que les meilleurs milieux de production d'antibactériens et d'antifongiques sont respectivement, le milieu AF et le milieu Bennett. En criblage primaire, deux types de souches bactériennes cibles ont été utilisées à savoir, des souches sensibles de références pour la mise en évidence des activités antibiotiques et des souches multirésistantes en fonction des besoins thérapeutiques. En effet, la recherche d'antibiotiques actifs contre des germes multirésistants constitue une des meilleures stratégies dans la découverte de nouveaux antibiotiques (**Ceylan *et al.*, 2008 ; Rajan et Kannabiran, 2010**). Ainsi, les deux souches étudiées sont actives contre des germes sensibles et résistants aux β -lactamines, aux sulfamides, à la tétracycline, à la vancomycine et au cotrimoxazole.

Le **criblage secondaire** a comme double objectif d'obtenir une production de molécules antibiotiques en culture liquide et d'examiner les activités de ces molécules, après extraction, dans une batterie de tests complémentaires. La comparaison entre l'extraction à partir de milieu liquide et celle à partir de milieu solide a montré que la deuxième est largement plus rentable que la première. Dans le criblage secondaire, il s'est avéré que les molécules bioactives produites au premier jour de culture des deux souches de *Streptomyces* sont stables aux températures élevées (jusqu'à 100°C), et à l'exposition à la lumière. Selon les résultats des CCM, les molécules bioactives de la souche S1 présentent un caractère polaire, par contre la souche S2 produit deux types de molécules, l'une polaire et l'autre est apolaire. Ceci a été confirmé après purification des trois fractions actives par HPLC.

Enfin, le **criblage tertiaire** constitue une étape de caractérisation précoce des métabolites bioactifs. La souche S1 produit une molécule active contre les bactéries à Gram positif, elle possède une structure aromatique avec une chaîne aliphatique et un maximum d'absorption en UV à 238nm et à 268nm. Sa masse moléculaire est de 573. Cette substance appartient probablement à la famille des céphalosporines mais ses propriétés ne ressemblent à aucune molécule connue, en plus, elle est fortement active

contre *Bacillus cereus* qui est normalement résistant aux β -lactamines ce qui confirme qu'il s'agit éventuellement **d'une molécule à structure particulière** qui peut détourner le mécanisme de résistance. La souche S2 produit deux molécules antibactériennes à structure aromatique avec une chaîne aliphatique, la première possède un caractère polaire et une masse molaire de 399 alors que la deuxième se comporte comme une molécule apolaire avec un poids moléculaire de 803 et est moins active que la première. Les analyses structurales ont montré qu'il s'agit de molécules de structure différente : la première s'approche beaucoup plus des céphalosporines avec une **structure particulière** puisqu'elle est également active contre *Bacillus cereus* résistant aux β -lactamines tandis que la deuxième se rapproche à la paulomycine tout en n'étant **pas identiques**.

Nos résultats supposent donc l'originalité des souches *Streptomyces* et des molécules antibactériennes produites. Ainsi, pour que cette étude soit complète, deux points essentiels devront être approfondis :

- L'identification des souches S1 et S2 par hybridation ADN-ADN avec les espèces proches déterminées durant l'étude des gènes codant l'ARNr 16S, pour confirmer qu'il s'agit bien de deux nouvelles espèces de *Streptomyces*.
- L'identification des molécules par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13 qui permet, en plus des techniques déjà employées, la détermination de la structure des fractions purifiées (**Silverstein et al., 2007**).

Dans le cas où ces molécules s'avèreraient nouvelles, des études complémentaires concernant le spectre d'activité biologique (étude de la bactériostase et de la bactéricidie, antibiogramme...etc.), la toxicité, l'activité *in vivo* devraient être envisagées. Ce n'est qu'après avoir satisfait à un certain nombre de critères que l'utilisation éventuelle de ces molécules pourra être envisagée en thérapeutique ou dans d'autres domaines. En revanche, elles peuvent alimenter la chimie de synthèse qui permet des améliorations à partir de structure de base qu'elle ne peut inventer elle-même. D'autre part, il serait intéressant d'étudier l'activité antifongique des deux souches en procédant à l'extraction/concentration en suivant la même stratégie et les mêmes techniques employées dans l'étude de l'activité antibactérienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aharonowitz Y. (1980) Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann Rev Microbiol.* 34: 209-233.

Al Bari M. A., Bhuiyan M. S., Flores M., Petrosyan P., Varela M. et Islam M.A. (2005) *Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl) phthalate. *Inter J Syst Evol Microbiol.*55: 1973-1977.

Alexander M. (1977) Introduction to soil Microbiology. *Krieger Publishing Company, Malabar:* 467-468.

Anderson S.A. et Wellington E.M. H. (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Inter J of Syst Evol Microbiol.* 51: 797-814.

Andreyuk K. I., Halagurova H.V. et Myatilkova K.A. (1990) Streptomycetes of standy biotopes at various stages of natural overgrowth. *Actinomycetes.* 1(3):75-78.

Argoudelis A. D., Brinkley T. A., Brodasky T. F., Buege J. A., Meyer H. F. et Mizens S. A. (1982) Paulomycins A and B isolation and characterization. *J Antibiot.* 35(3): 285-294.

Atta H. M. (2009) An Antifungal Agent Produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus*, AZ-SH514. *World Appl Sci J.* 6 (11): 1495-1505.

Atta H.M., Dabour S.M. et Desoukey S.G. (2009) Sparsomycin antibiotic production by *Streptomyces* sp. AZ-NIOFDI: Taxonomy, fermentation, purification and biological activity. *J Agric & Environ Sci.* 5(3): 368-377.

Attwell R.W. et Cross T. (1973) Germination of Actinomycete spores, dans: Actinomycetales. Characteristics and practical importance. *Academic Press London:* 197-206.

Augustine S. K., Bhavsar S. P. et Kapadnis B. P. (2005) A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J Biosci.* 30(2): 201-211.

Awad M. , Elshahed K. et Elnakkadi A. (2009) Isolation, Screening and identification of newly isolated soil *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. NRC-35) for β -lactamase inhibitor production. *World Appl Sci J.* 7(5):637-646.

Barry A.L., Garcia F. et Thrupp L.D. (1970) An improves single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens . *Am J Clin Pathol.* 53: 149-158.

Ben Ameer Mehdi R., Sioud S., Fourati Ben Fguira L., Bejar S. et Mellouli L. (2006) Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Proc Biochem.* 41: 1506-1513.

Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.I., Thomson N.R., James K.d., Harris D.E. et al. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 417(6885):141-7.

Berdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*. 58 :1-26.

Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Oulmi L., Boudemagh A., Kitouni M. et Boulahrouf A. (2005) Isolement d'Actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhha de Ain Mlila. *Sciences et Technologies*. 23 : 5-10.

Bouizgarne B., Lanoot B., Loqman S., Sproer C., Klenk H.P., Swings J. et Ouhdouch Y. (2009) *Streptomyces marokkonensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Argania spinosa* L. *Inter J Syst Evol Microbiol*. 59: 2857-2863.

Brooks G.F., Butel G.S. et Auruston L.N. (1995) Medical Microbiology. *Printice Hall International Inc USA*: 137-149.

Burianek L.L. et Yousef A.E. (2000) Solvent extraction of bacteriocins from liquid culture. *Let App Microbio*.31: 193-197.

Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S. (2008) Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35:49-58.

Bycroft B.W., Hington A.A. et Roberts A.D. (1988) Dictionary of antibiotics and related substances. *Chapman and Hall Edition, London New York*.

Calamita H.G. et Doyle R.J. (2002) Regulation of autolysins in teichuronic acid containing *Bacillus subtilis* cells. *Mol Microbiol*. 44: 601-606.

Canu A. et Leclercq R. (2001) Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition : the case of streptogramins. *Cur Drug Targets Infect Disord*. 1: 215-225.

Carter A.P., Clemon W.M., Brodersen D.E., Morgan-Worren R.J., Winberly B.T. et Ramakrishnan V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosome subunit and its interaction with antibiotics. *Nature*. 407: 340-348.

Cavala M. et Eberlin T. (1994) Isolement des Streptomycètes du sol. *L'opéron*. 4 : 13-17.

Centers of Diseases Control and Prevention CDCP (1997) *Staphylococcus aureus* with reduced succetibility to vancomycin- United States. *Morbid Mortal Weekly Rep*. 46: 765-76.

Ceylan O., Okmen G. et Ugur A. (2008) Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Eur Asia J BioSci*. 2: 73-82.

Chaphalkar S.R. et Dey S. (1996) Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. *Actinomycete*. 7(2): 47-54.

Chaubal M.V., Pyne G.F., Reynolds C.H. et Albright R.L. (1995) Equilibria for the absorption of antibiotics into neutral polymeric sorbents. *Biotechnol Bioeng.* 47: 215-226.

Coombs J.T. et Franco C.M. M. (2003) Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol.* 69(9): 5603-5608.

Crawford D. L., Lynch J. M. et Ousley M.A. (1993) Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol.* 59(11): 3899-3905.

Dastager G. S., Agasar D. et Pandey A. (2009) Production and partial purification of amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:189-194.

Davelos A., Kinkell L. et Samac D. (2004) Frequency and intensity of antibiotics interaction among *Streptomyces* from Prairie soil. *Appl Environ Microbiol.* 70(2): 1051-1058.

Deshayes C., Falconer C., Mazieres N., Saddler G, Sanglier J.J. et Sire B. (1989) Sélection des souches productrices et caractérisation des molécules actives, dans : Larpent J.P. et Sanglier J.J. Biotechnologie des antibiotiques. *Masson Edition Paris:* 72-138.

Dhanasekaran D., Selvamani S., Panneerselvam A. et Thajuddin N. (2009). Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estuary, Annagkoil, Tamil Nadu. *Afr J Biotechnol.* 8 (17): 4159-4162.

Dietera A., Hamm A., Fiedler H.P., Goodfellow M., Muller W.E., Brun R. et Bringmann G. (2003) Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain. *J Antibiot.* 56: 639-46.

Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L. et Beaulieu C. (2001) Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* 82(3): 85-102.

Dumenil G. et Sanglier J.J. (1989) Physiologie de la production des antibiotiques, dans : Larpent J.P. et Sanglier J.J. Biotechnologie des antibiotiques. *Masson Edition Paris :* 195-217.

Escalente L., Ramos I., Imrokova I., Lagley E. et Sanchez S. (1999) Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peuceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52: 572-579.

Fernandez M. et Sanchez J. (2002) Nuclease activity and cell death processes associated with development of surface culture of *Streptomyces antibioticus* ETH7451. *Microbiology.* 148: 405-412.

Fourati Ben Fguira L., Fotso S., Ben Ameer Mehdi R., Mellouli L. et Laatsch H. (2005) Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. US80 strain. *Research in Microbiology.* 156 (3): 341-347.

Geraldine M., Schofield M. et Schaal K.P. (1981) A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J Gen Microbiol.* 127: 237-259.

Getha K., Vikineswary S., Wong W. H., Seki T., Ward A. et Goodfellow M. (2005) Evaluation of *Streptomyces sp.* strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32: 24-32.

Goodfellow M. et Williams S.T. (1983) Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.* 37: 189-216.

Groth J., Vettermann R., Schutze B., Shumann P. et Saiz-Jimenz C. (1999) Actinomycete in Karstic caves of northern Spain. *J Microbiol method.* 36: 115- 122.

Guernet M. et Hamon M. (1981) Abrégé de chimie analytique (tome 1). *Masson Edition Paris* : 8-12.

Guiraud J.P. (1998) Techniques d'analyse microbiologique, dans : Microbiologie alimentaire. *Dunod Paris*: 171-334.

Hasavada S. H., Thumar J. T. et Singh S. P. (2006) Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science.* 91(10): 1393-1397.

Herman T. (2005) Drug targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol.* 15(3): 355-366.

Hilali L., Khattabi A., Nssarallah N., Malki N. et Finance C. (2002) Isolement de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir de milieu naturel marocain. *Rev Biol Biotech.* 2: 49-53.

Hiramatsua K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T. et Tenover F.C. (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin succetbibility. *J Antimicrob Chemother.* 40: 135-46.

Hodgson D.A. (1992). Differentiation in actinomycete, dans : Mohan S., Dow C. et Cole J.A. Procaroyotic structure and function. Society of General Microbiology Symposium 47. *Campridge University Press Edition*: 407-440.

Hodgson D.A. (2000) Primary metabolism and its control in Streptomycetes: a most unusual group of bacteria. [*Adv Microb Physiol.* 42:47-238.](#)

Holmberc K. (1978) Laboratory tests of antifungal drugs in treatment of systemic mycoses. *Scand J Infect Dis.* 16: 65-73.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J. et Williams S.T. (1994) Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology. *Williams & Wilkins, USA*: 611-703.

Hopwood D.A. (1999) Forty years of genetic with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico* (review article). *Microbiology.* 145: 2183-2202.

- Hopwood D.** (2007) An introduction to the actinobacteria. *Microbiology Today*: 60-61.
- Hulya A.K. et Tarhan L.** (2006) Vancomycin antibiotic production and TCA-glyoxalate pathways depending on the glucose concentration in *Amycolatopsis orientalis*. *Enzyme Microb Technol.*38:727-734.
- Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y. et Moon S.S.** (2001) Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenyl acetate from *Streptomyces humidus*. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3730-3745.
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. et Omura S.** (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology.* 21(5): 526-531.
- Ilic S.B., Konstantinovic S.S. et Todorovic Z.B.** (2005) UV/VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Medecine and Biology.* 12(1): 44-46.
- Iwai W. et Omura S.** (1982) Culture conditions for screening of new antibiotics. *J Antibiot.* 35: 123-141.
- Kampfer P., Kroppenstedt R. M. et Dott W.** (1991) A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *J Gen Microbiol.*137:1831-1891.
- Kang M. J., Strap J. L. et Crawford D. L.** (2010) Isolation and characterization of potent antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against *Candida albicans*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37:35-41.
- Katsifas E. A., Gianoutsou E.P. et Karagouni A.D.** (1999) Diversity of Streptomycetes among specific greek terrestrial ecosystems. *Let App Microbiol.* 29: 48-51.
- Khamna S., Yokota A., Peberdy J. et Lumyong S.** (2009) Antifungal activity of *Streptomyces spp.* Isolated from rizosphere of Thai medicinal plants. *Intern J Integr Biol.* (6) 3: 143-147.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. et Hopwood D. A.** (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation, Norwich, UK* : 613.
- Kim B. S., Lonsdale J., Seong C.N., et Goodfellow M.** (2003) *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* . *Ant. V Leeuwenhoek.* 83:107-116.
- Koch A.** (1999) Diffusion through agar blocks of finite dimensions: A theoretical analysis of three systems of practical significance in microbiology. *Microbiolgy.*145: 643-654.
- Korn-Wendisch F. et Kutzner H. J.** (1992) The family *Streptomycetaceae*, dans: Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W et Schleifer K. H. The Prokaryotes. *Springer Edition New York*: 921-995.

Kudo T., Matsushima K., Itoh T., Sasaki J. et Suzuki K. (1998) Description of four new species of the genus *Kineosporia*: *Kineosporia succinea* sp. nov., *Kineosporia rhizophila* sp. nov., *Kineosporia mikuniensis* sp. nov. and *Kineosporia rhamnosa* sp. nov., isolated from plant samples, and amended description of the genus *Kineosporia*. *Int J Syst Bacteriol.*48: 1245-1255.

Labeda D. P. (1992) DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. *Gene*. 115: 249-253.

Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vancanneyt M., Swings J. et al. (2012) Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101:73-104.

Labro M. (2002) Cellular accumulation of macrolide antibiotics. Intracellular bioactivity, dans : Kirst H. et Shonfeld W. Macrolides. *Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin*: 37-52.

Lacey J. (1997) Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*. 4: 113-121.

Lakshmipathy D. T. et Kannabiran K. (2009) A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* sp. isolated from Saltpan environment. *Am J Infect Dis*. 5 (3): 207-213.

Langham C. D., Williams S. T., Sneath P. H. A. et Mortimer A. M. (1989) New probability matrices for identification of *Streptomyces*. *J Gen Microbiol*. 135: 121-133.

Lanoot B., Vancanneyt M., Dawyndt P., Cnockaert M., Zhang J., Huang Y., Liu Z. et al. (2004) BOX-pCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microbiol*. 27(1): 84-92.

Lechevalier H.A. et Lechevalier M.P. (1981) Introduction to the order Actinomycetales, dans : Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Ballows A. et Schlegel H.G. The prokaryote (volume 2). *Springer-Verlag Edition Berlin* : 1915-1922.

Lechevalier M.P. (1988) Actinomycetes in agriculture and forestry, dans : Goodfellow M.P., Williams S.T. et Mordarski M. Actinomycetes in biotechnology. *Academic Press Edition California*: 327-358.

Lee S.D., Kang S. O. et Hah Y. C. (2000) *Catellotospora koreesis* sp. Nov., a novel Actinomycete isolated from a gold mine cave. *Inter J Syst Evol Microbiol*. 50: 1103-1111.

Livermore D.M. (2004) The need for new antibiotics. *Clinical Microiol Infect*. 10 (4): 1-9.

Logan N. A. (1994) Bacterial Systematics. *Oxford: Blackwell Scientific Publication*: 44-67.

Lohr D., Buschulte T. et Gilles E.D. (1989) Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. *Appl Microbiol Biotechnol*. 32:274-279.

- Loria R., Bukhalid R.A., Fry B.A. et King R.R.** (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*. 81(8): 836-846.
- Mackay S.J.** (1977) Improved enumeration of *Streptomyces spp.* on starch-casein salt medium. *Appl Env Microbiol*. 33(2): 227-230.
- Madigan M. T., Martinko J.M. et Parker J.** (1997) Biology of microorganisms. *Printice Hall International Inc, New York*: 146-147.
- Madigan M. T et Martinko J.M.** (2007) Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11^e édition : 331-423, 686-718.
- Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yague P. et Sanchez J.**(2008) Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged culture of *Streptomyces coelicolor*. *Appl & Environ Microb*. 74: 3877-3886.
- Mariat F. et Sebald M.** (1990) Les actinomycètes, dans : Leminor L. Bactériologie médicale. *Médecine Science Flammarion Edition France*: 54-62.
- Marinelli F.** (2009) Antibiotics and *Streptomyces*: the futur and antibiotic discovery. *Microbiology today*. 2: 20-23.
- Martin S.M. et Demain A.L.** (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev*. 44: 230-261.
- Mc Bride M.J. et Ensign J.C.** (1986) Effect of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J Bacteriol*. 169(11): 4995-5001.
- Mellouli L., Ben Ameer-Mehdi R., Sioud S., Salem M. et Bejar S.** (2003) Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a new isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology* 154: 345-352.
- Miguel E.M., Hardisson C. et Manzanal M.B.** (2000) Streptomycete : a new model to study cell death. *Inter Microbiol*. 3: 153-158.
- Nascimento R.P., Coelho R.R. R., Marques S., Alves L., Girio F.M., Bon E.P.S. et Amaral-Collaco M.T.** (2002) Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. Strain AMT-3 isolated from brazilin cerrado soil. *Enzyme Microb Technol*. 31: 549-555.
- Oiwa R.** (1992) Antibacterial agents, dans : Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. *Spring-Verlag, New York*: 1-29.
- Olson E. et Rattzkin B.** (1999) Pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 10: 525-527.
- Omura S. et Tanaka Y.** (1986) Macrolide antibiotics, dans: Rehm H.J. et Reed J. Biotechnology. *Weinheim VCH Verlas Jeselles Chافت*. 359-391.

- Oskay M.** (2009) Antifungal and antibacterial compound from *Streptomyces* strains. *Afr J Biotechnol.* 8 (13): 3007-3017.
- Osono T., Watanabe S., Saito T., Gushima H., Murakami K., Takahashi I., Yamaguchi H. et al.** (1980) Oganomycins, new 7 methoxycephalosporins produced by precursor fermentation with heterocyclic thiols. *J Antibiot.* 1074-1978.
- Pandey A., Shukla A. et Majumdar S.K.** (2005) Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Antibacterial antibiotic. *Afr J Biotechnol.* 4 (9): 909-910.
- Peterson E.A.** (1954) A study of cross antagonisms among some actinomycetes active against *Streptomyces scabies* and *Helminthosporium sativum*. *Antibiot Chemother.* 4: 145-149.
- Petrosyan P., Gartia-Varela M., Luz-Madriral A., Huitron C. et Flores M.E.** (2003) *Streptomyces mexicanus*, a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Int J Sys Budevo Microbiol.* 53: 269-273.
- Poly M.C., Greland C., Martin D., Lumeley L. et Denis F.** (1998) First clinical isolat of vancomycin intermediated *Staphylococcus aureus* in French hospital. *Lancet.* 351:1212.
- Prapagdee B., Kuekulvong C. et Mongkolsuk S.** (2008) Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int J Biol Sci.* 4(5): 330-337.
- Preobrazhenskaya T.P. et Sveshnikova M.A.** (1957) Problems of classification of actinomycetes- antagonists, dans Gauze, G.F., Preobrazhenskaya T.P., Kudrina E.S., Blinov N.O., Ryabova I.D. et Sveshnikova M.A. *Government Publishing House of Medical Literature, Medgiz, Moscow* : 1-39.
- Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A.** (2007) Microbiologie. *De Boek & Larcier, Bruxelles* : 805-825.
- Pridham T.G.** (1965) Color and Streptomycetes. Report of an international workshop on determination of color of streptomycetes. *Appl Microbiol.* 13:43-6.
- Pridham T.G. et Tresner H.D.** (1974) Family Streptomycetaceae, dans : Buchanan R.E. et Gibbons N.E. *Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, USA:* 747-829.
- Pine L.** (1970) Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *Int J Bacteriol.* 20: 445-474.
- Rajan B. M. et Kannabiran K.** (2010) Antimicrobial activity of *Streptomyces albofaciens* vitbrk1 spp. isolated from the bay of Bengal coast of Tamil Nadu, India. *Pharmacologyonline.* 1: 124-132.

Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Oulmi L. Kitouni M., Boudmagh A. et Boulahrouf A. (2006) Activité antibactérienne d'actinomycète rare isolée d'échantillon de sol aride du sud est algérien. *Antibiotiques*. 8 : 2-6.

Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. et Cole E.C. (1998) Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl Environ Microbiol*. 64 : 3807-3812.

Saisivam S., Bhikshapathi D.V., Krishnaveni J. et Kishan V. (2008) Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*-An Indian soil isolate. *Indian J Biotechnol*. 7: 349-355.

Saitou N. et Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4: 406-425.

Samac D., Willert M., McBride M. et Kinkel L. (2003) Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Appl Soil Ecol*. 22: 55-66.

Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*. 74 : 5463-5467.

Sanglier J.J. et Trujillo M. (1997) Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol*. 12: 13.

Sejiny M. (1991) Growth phases of some antibiotics producing *Streptomyces* and their identification. *J K A U Sci*. 3: 21-29.

Seo G., Kim J. et Choi D. (2010) Antibiotic Production from *Streptomyces fradiae* SF-12 using Wasted Crude Vegetable Oil as an Energy Source. *J Adv Engin Technol*. 3(3): 251-254.

Sharma R., Sharma C.L. et Kapoor B. (2005) Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian J Med Sci*. 59: 120-129.

Shikha D., Rup L. et Manjit H. (2005) Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresour Technol*. 96: 1415-1418.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*. 16(3): 313-340.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1968a) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study. *Int J Syst Bacteriol*. 18: 69-189.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1968b) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int J Syst Bacteriol*. 18: 279-392.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1969) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int J Syst Bacteriol*. 19: 391-512.

- Shirling E. B. et Gottlieb D.** (1972) Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. *Int J Syst Bacteriol.* 22: 265-394.
- Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M. et Nida T.** (1979) Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiot.* 32 : 427-435.
- Silverstein R.M., Webster F.X. et Kiemle D.J.** (2007) Identification spectrométrique de composés organiques. *De Boeck & Larcier Edition, Bruxelles:* 70-110.
- Silvey J.K.G. et Roach A.N.** (1975) The taste and odor producing aquatic actinomycete. *Crit Rev Environ Control.* 5: 233-373.
- Singleton P.** (1999) Bacteria in biology, bacteriology and medicine. *Wiley, Chichester UK:* 236.
- Stackebrandt E. et Goebel B.M.** (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt E., Liesack W., Webb R. et Witt D.** (1991a) Towards a molecular identification of *Streptomyces* species in pure culture and in environmental samples. *Actinomycetologia.*5: 38-44.
- Stackebrandt E., Witt D., Kemmerling C., Kroppenstedt R. et Liesack W.** (1991b) Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 57: 1468-1477.
- Stackebrandt E., Rainey F. A. et Ward-Rainey N. L.** (1997) Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 479-491.
- Stackebrandt E. et Schumann P.** (2006) Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria, dans: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. Prokaryotes. *Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA:* 297-321.
- Stoks S.M. et Thomas C.R.** (2001) Viability, strength and fragmentation of *Saccharopolyspora erythrae* in submerged fermentation. *Biotechnol and Bioeng.* 75 (6): 702-709.
- Syed D.G., Dayanand A. et Pandey A.** (2009) Production and partial purification of amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:189-194.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. et Kumar S.** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731-2739.

Tanaka Y. (1992) Fermentation processes in screening for new bioactive substances, dans: Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. *Spring-Verlag, New York*: 303-326.

Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. (2003) Introduction à la microbiologie . *Edition de Renouveau pédagogique, Québec*: 602-632.

Tortorano A.M., Cabrini E. et Viviani M.A. (1979) Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gélose et méthode des disques. *Bull Soc Fr Myc Med.* 8: 69-74.

Uchida A. et Seino A. (1997) Intra and inter generic relationships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycane examined in glycolate test. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 182-190.

Vercesi A., Volpi E. et Locci R. (1990) Preliminary investigations of the *Streptomyces* flora of grapevine berries. *Actinomycetes* 1(1): 1-2.

Viollier P., Minas W., Dele G., Folcher M. et Thompson C. (2001) Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor*: Morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol.* 183(10): 3184-3192.

Voelker F. et Altaba S. (2001) Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology.* 147: 2447-2459.

Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K. et Sudha S. (2008) Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afr J Biotechnol.* 7(18): 3225-3230.

Waksman S.A. (1963) Ma vie avec les microbes. *Albin Michel Edition USA*: 280.

Waksman S. A. et Henrici A. T. (1943) The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol.* 46: 337-341.

Walch C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 406: 775-781.

Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. et Bhole B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol.* 176: 386-390.

Williams S.T. et Cross T. (1971) Actinomycetes, dans: Methods in microbiology. *Academic Press, London*: 295-334.

Williams S.T., Goodfellow M. et Alderson G. (1989) Genus *Streptomyces*, dans: Williams S.T., Sharpe M.E. et Holt J.H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (volume 4). *Williams & Wilkins, USA*: 2452-2492.

Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M. H., Sneath P. H. A. et Sackin M. J. (1983a) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol.* 129: 1743-1813.

Williams S. T., Goodfellow M., Wellington E. M. H. Vickers J. C., Alderson G., Sneath P. H. A., Sackin M. J. et al. (1983b) A probability matrix for identification of some streptomycetes. *J Gen Microbiol.* 129: 1815-1830.

Witt D. et Stackebrandt E. (1990) Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943, 339AL. *Syst Appl Microbiol.* 13: 361-371.

Xu L.H., Li Q.R. et Jiang C.L. (1996) Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol.* 62: 244-248.

Zaitlin B., Watson S., Dixon J. et Steel D. (2003) Actinomycetes in Elbow River Basin Alberta Canada. *Water Qual Res J Canada.* 38(1): 115-125.

Zhang Z., Wang Y. et Ruan J. (1997) A proposal to revive the genus *Kitasatosporia* . *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1048-1054.

Zhu C., Lu F., He Y., Han Z. et Du L. (2007) Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effects of glucose, ammonium ion, and inorganic phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:1031-1038.

ANNEXES

Annexe 1

Milieux de culture et solutions pour l'identification des souches

Milieu ISP 1

Tryptone.....5g/l

Extrait de levure.....3g/l

pH : 7,0 -7,1

Milieu ISP2

Agar.....20g/l

Extrait de levure.....4g/l

Extrait de malt.....10g/l

Glucose.....4g/l

pH : 7,3

Milieu ISP3

Solution d'avoine.....1000ml

Solution saline¹.....1ml

pH : 7,2

Milieu ISP4

Agar.....20g/l

Amidon soluble.....10g/l

NaCl.....1g/l

CaCO₃.....2g/l

K₂HPO₄.....1g/l

MgSO₄.7H₂O.....1g/l

(NH₄)₂ SO₄.....1g/l

Solution saline¹.....1ml

pH : 7,0 -7,4

Milieu ISP5

Agar.....20g/l

Glycerol.....10g/l
L-asparagine.....1g/l
K₂HPO₄.....1g/l
Solution saline¹.....1ml
pH : 7,0 -7,4

Milieu ISP6

Agar.....20g/l
Peptone.....15g/l
Protéose peptone.....5g/l
Citrate de fer ammoniacal.....0,5g/l
Thiosulfate de sodium.....0,08g/l
Extrait de levure.....1g/l
K₂HPO₄.....1g/l
pH : 7,0 -7,2

Milieu ISP7

Agar.....20g/l
Glycerol.....15g/l
L-asparagine.....1g/l
K₂HPO₄.....0,5g/l
NaCl.....0,5g/l
FeSO₄ 7H₂O.....0,01g/l
pH : 7,2 -7,4

Milieu ISP9

Agar.....20g/l
KH₂PO₄.....2,38g/l
K₂HPO₄.....5,65g/l
MgSO₄.7H₂O.....1g/l
(NH₄)₂ SO₄.....2,64g/l
Solution saline²1ml
pH : 6,8 -7,0

Milieu CYD

Agar20g/l
Casamino acids0,5g/l
Extrait de levure 0,3g/l
Glucose...0,4g/l
K₂HPO₄.....2 g/l
pH : 7,2

Solution saline 1

FeSO₄.7H₂O.....1g/l
ZnSO₄.7H₂O.....1g/l
MnCl₂.4H₂O.....1g/l

Solution saline 2

FeSO₄.7H₂O.....1,1g/l
CuSO₄.5H₂O6,4g/l
ZnSO₄.7H₂O.....1,5g/l
MnCl₂.4H₂O.....7,9g/l

Solution d'avoine

Grains d'avoine pilés.....20g
Eau distillée.....1000ml
Faire bouillir pendant 20mn
Filtrer sur gaze et réajuster le volume à 1000ml

Annexe 2

Milieux de culture pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes

Milieu AF

Agar.....15g/l
Extrait de levure.....4g/l
Extrait de malt.....10g/l
Glucose.....2g/l
NaCl.....2,5g/l
CaCO₃.....1 g/l
pH : 7,0

Milieu Bennett

Agar.....15g/l
Extrait de levure2g/l
Extrait de viande.....1g/l
Peptone2g/l
Glucose.....10g/l
pH : 7,3

Milieu GBA

Agar.....15g/l
Amidon.....20g/l
Glycérol.....20g/l
Peptone.....10g/l
Extrait de viande5g/l
CaCO₃.....3g/l
pH : 7,0

Milieu SC

Agar.....20g/l
Glycérol.....30g/l
Saccharose.....30g/l
NaNO₃.....2g/l

K₂HPO₄.....1g/l
MgSO₄.7H₂O..... 0,5g/l
KCl.....0,5g/l
L-asparagine.....0,5g/l
FeSO₄.7H₂O.....0,01g/l
pH : 7,0

Milieu synthétique

Agar.....20g/l
Amidon.....40g/l
K₂HPO₄.....1,5g/l
CaCO₃.....3g/l
MgSO₄.....0,5g/l
FeSO₄.7H₂O.....0,0278g/l
CuSO₄.5H₂O0,0025g/l
ZnSO₄.7H₂O.....0,287g/l
MnSO₄.7H₂O.....0,0024g/l
pH : 7,0

Milieu Mueller-Hinton

Agar10g/l
Extrait de viande.....2g /l
Hydrolysate acide de caséine.....17,5g/l
Amidon.....1,5 g/l
pH : 7,0

Milieu Sabouraud

Agar.....15g/l
Peptone10g/l
Glucose.....40g/l
pH : 7,0

Milieu à l'extrait de malt

Agar.....15g/l

Peptone5g/l

Extrait de malt.....20g/l

pH : 7,0

Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux antibiotiques élaborés par des actinomycètes originaires des milieux extrêmes. L'activité antibactérienne de deux souches de *Streptomyces* sp. isolées d'eau de Sebkha d'Ain Mlila a été mise en évidence contre des souches-cibles sensibles de références. Le test de mise en évidence des activités antimicrobiennes réalisés sur cinq milieux de culture différents, a révélé que les deux souches S1 et S2 sont douées d'activités antibactérienne et antifongique dont l'importance varie selon le milieu de culture et les souches tests employées. Ces molécules se sont avérées, également, actives contre des bactéries résistantes aux β -lactamines, aux sulfamides, à la tétracycline, à la vancomycine et au cotrimoxazole. Les études phénotypiques et phylogénétiques des deux souches ont montré qu'il s'agit probablement de deux nouvelles espèces. L'extraction des molécules antibactériennes, à partir des milieux solides, est largement plus rentable que celle effectuée à partir des mêmes milieux liquides. Ces molécules bioactives produites au premier jour de culture sont stables aux températures élevées (jusqu'à 100°C), et à l'exposition à la lumière, celles de la souche S1 présentent un caractère polaire, par contre la souche S2 produit deux types de molécules de polarité différente selon les résultats des CCM. Les molécules bioactives contenues dans ces trois fractions sont purifiées par HPLC analytique et préparative. Enfin, les analyses structurales réalisées par des méthodes spectroscopiques ont montré que la souche S1 produit une molécule bioactive dont la masse et les propriétés sont les plus proches d'une céphalosporine (l'oganomycine GF) avec quelques dissemblances, ce qui suppose qu'il s'agit probablement d'un dérivé de cette molécule ou d'une nouvelle molécule. En revanche, la souche S2 produit deux molécules antibactériennes de structure différente, la première ressemble beaucoup plus à des céphalosporines avec une structure particulière tandis que la deuxième peut être rapprochée de la paulomycine, ce qui laisse supposer qu'il s'agit, probablement, de nouvelles molécules antibiotiques dans les deux cas.

Mots clés : Sebkha, actinomycètes, *Streptomyces*, antibiotique, analyse structurale.

Abstract

In the search for new antibiotics from actinomycetes, investigating extremes habitats enhances the probability of isolating novel producers. In this context, the antibacterial activity of two *Streptomyces sp.* strains isolated from salt pans's water (Ain Mlila) was revealed. The antimicrobial activities test realized on five different cultural media revealed that both S1 and S2 strains showed antibacterial and antifungal activities, the importance of which varies according to culture medium and the strains tests. These molecules are, also, active against β -lactamines, sulfamide, tetracycline, vancomycine and cotrimoxazole resistant bacteria. . The phenotypic and phylogenetic studies of the strains show that they represent probably new species.

The antibacterial molecules extraction, from solid media, is widely more advantageous than that made from the same liquid media. These bioactive molecules produced in the first day of culture are stable in the high temperatures (until 100°C), and in the light exposition. According to the TLC results, S1 strain produces one type of polar antibacterial molecule, whereas S2 strain produces two types of different polarity. The bioactive molecules contained in these three fractions are purified by preparative and analytical HPLC.

Finally, the structural analysis realized by spectroscopic methods showed that S1 strain produces an antibacterial molecule with cephalosporin properties (oganomycine GF) with some disparities, what supposes that it is probably about a new molecule. While the S2 strain produces two antibacterial molecules of different structure, the first one approach many more cephalosporin with a particular structure whereas the second gets closer to the paulomycine but are not identical, what supposes that it is, probably, about new molecules antibiotics in both cases.

Keywords: salt pans, actinomycete, *Streptomyces*, antibiotic, structural analysis.

ملخص

في إطار البحث عن مضادات حيوية جديدة منتجة من طرف البكتيريا الخيطية (أكتينوميستات) المعزولة من أوساط بيولوجية ذات ظروف بيئية قصوى , تم كشف و دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للسالتين تابعة لجنس *Streptomyces* تم عزلها من ماء سبخة عين مليلة.

السالتين تملك نشاط مضاد للبكتيريا و للفطريات تم دراسته على خمس أوساط زرع مختلفة , النتائج بينت من جهة أن إظهار هذه النشاطات تعتمد على وسط الزرع و الكائن المجهرى التجريبي المستعمل , و أن هذه الجزيئات تملك نشاط ضد بكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية (لاكتامين , سولفاميد , ديدراسيكلين , فاكوميسين , كودريموكزازول)

دراسة الصفات الظاهرة و الجينية للسالتين أبدت إنتماءهما إلى سالتين جديدتين إستخلاص الجزيئات المثبطة للبكتيريا من أوساط زرع صلبة كانت أكثر فاعلية من مستخلصات من نفس أوساط الزرع السائلة , هذه الجزيئات الفعالة المنتجة في أول يوم نمو تبقى مستقرة في درجات حرارة مرتفعة (حتى 100° م) , و عند التعرض إلى الضوء تلك المنتجة من السلالة تملك سلوك قطبي , بينما تنتج السلالة نوعين من الجزيئات ذات قطبية مختلفة و ذلك حسب نتائج تقنية كروماتوغرافية , فتنقيت هذه الجزيئات تم بإستعمال تقنية , بينما تم دراسة تركيبية كل واحدة بإستعمال تقنيات طيفية , هذه الأخيرة بينت أن السلالة تنتج مركب ذات خواص قريبة من

l'organomycine GF

مع بعض الإختلافات مما يرجح كونها مركب جديد , بينما تنتج السلالة مركبين : الأول قريب من قسم سيفالوسبورين مع تركيبية مميزة , و الثاني قريب من

Polomycine

مع بعض إختلافات مما يرجح في الحالتين وجود جزيئات فعالة جديدة .

الكلمات المفتاحية :

Streptomyces مضاد حيوي , جزيئة , تركيبية , سبخة