

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Aboubakr Belkaid  
Tlemcen



Institut des Sciences de la Nature

# Thèse

Pour l'obtention du Magister

Option : *Biologie Cellulaire et Moléculaire*

## Thème

Etude des antibiotiques biosynthétisés par  
des bactéries filamenteuses extrêmophiles,  
notamment *Metallogenium sp*

Présentée par : **Mme KHÉLIL née Klouche Nihel**

Soutenue le :

Devant le Jury :

Président : **Mr. BENYOUCEF M.**

*Docent ISM - Tlemcen*

Rapporteur : **Mr. HACENE H.**

*Maître de conférences U.S.T.H.B. Alger.*

Examineur : **Melle FORTAS Z.**

*Professeur Sénia Oran*

Examineur : **Mr. KARAM N.E.**

*Maître de conférences Sénia Oran*

Examineur : **Mr. ABDELOUAHED A.**

*Maître Assistant ISN - Tlemcen*

## DEDICACES

Je dédie cette thèse...

*A* Mr KLOUCHE Abdelhamid, mon père, et ma mère  
Salima.

*A* Mes frères et soeurs:  
Tsouria, Lotfi, Rita, Kada, Lamia et Djamel

*A* H avec toute ma tendre affection

## REMERCIEMENTS

A notre jury de thèse

Monsieur HACENE Hocine (Rapporteur)

Maître de conférences U.S.T.H.B ALGER

Vous nous avez inspiré le sujet de ce travail, nous honorant ainsi de votre confiance.

Votre dynamisme et votre compétence en microbiologie furent un soutien moral autant que scientifique.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profonde gratitude.

Monsieur BENYOUCEF M. (Président)

Docent I.S.M TLEMCEN

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury.

Nous avons pu apprécier votre immense disponibilité.

Soyez assuré de toute notre reconnaissance et de notre profond respect.

Melle FORTAS Z. (Examineur)

Professeur Sénia ORAN

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger notre travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

Monsieur KARAM N.E. (Examineur)

Maître de conférences Sénia ORAN

Nous nous félicitons de vous avoir pour juge et nous vous exprimons notre reconnaissance.

Monsieur ABDELOUAHED A. (Examineur)

Maître assistant I.S.N TLEMCEN

Nous vous remercions d'avoir participé à notre Jury. Nous vous prions de croire en notre respectueux attachement.

Mes sincères remerciements s'adressent également à:

- Monsieur Feu G.LEFEBVRE, Professeur à l'E.N.S.A.I.A de NANCY qui m'a accueilli dans son laboratoire pour un stage de trois mois avec beaucoup de gentillesse.

Qu'il trouve ici l'assurance de toute ma reconnaissance.

- Monsieur LEBRIHI A., Professeur à l'E.N.S.A.I.A pour ses conseils et sa disponibilité.

- Toute l'équipe de Microbiologie, en particulier Cathy, Frédéric, Aziza, Chawki, Marianne, Anne pour leur aide et leur accueil au sein du laboratoire.

- Tous mes amis, en particulier C.BEGHDAD, L.LAMARI, S.BOUTAIBA.

- Mme KHELIL F. pour ses conseils judicieux.

## RESUME

Notre travail entre dans le cadre de la connaissance et de la valorisation biotechnologique des ressources microbiennes extrêmophiles peu ou non exploitées jusqu'à présent. Nous nous sommes intéressés à la production de substances antibiotiques élaborées par des bactéries filamenteuses (Actinomycètes et bactéries métalliques) isolées d'un lac salé et pollué: celui d'El Goléa.

Le travail expérimental et les résultats ont été scindés en deux parties:

Dans la première partie, nous exposons les méthodes portant sur:

- Les isolements sélectifs de souches d'Actinomycètes et des genres apparentés.

- L'identification des isolats étant très particulière par rapport aux autres bactéries, il a fallu étudier les isomères de l'acide diaminopimélique (D.A.P) de la paroi dans les hydrolysats cellulaires pour identifier 94 souches.

Pour d'autres, l'étude en microscopie électronique à balayage a été indispensable.

Les résultats ont fait apparenter: 40 isolats au genre *Streptomyces*, 35 à *Micromonospora* et 19 à *Thermoactinomyces*.

Les 45 autres souches appartiennent à d'autres genres (*Metallogenium*). L'identification de celles-ci est rendue difficile en raison du fait que leur isolement en culture pure est presque impossible.

- L'étude de l'activité antibiotique de tous les isolats a été effectuée; seuls 30 présentent une activité antibactérienne et/ou antifongique dont deux souches: la A125M et la C25SM apparentées aux bactéries métalliques du genre *Metallogenium*, ont toutes deux une activité très intéressante:

La première est active d'une manière spécifique contre *Candida albicans* et la seconde antibactérienne.

Ces deux souches ont été sélectionnées pour l'étude de la production des substances antibiotiques.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous entamons la production proprement dite; elle consiste à:

- L'extraction des produits avec des solvants organiques de différentes polarités.
- Effectuer quelques tests préliminaires, en particulier la stabilité des molécules actives à diverses températures et valeurs de pH.
- La purification des molécules par:

- \* chromatographie sur couche mince de silice, méthode qui permet de repérer assez vite si une souche produit un ou plusieurs métabolites, parallèlement, des révélations chimiques sont réalisées.

- \* chromatographie préparative d'acide silicilique qui permet de préparer les premières petites quantités de produits semi-purifiés.

- \* chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse.

Les petites quantités d'antibiotiques seront utilisées pour les études spectroscopiques (UV visible IR infrarouge).

Nous sommes arrivés à une caractérisation plus ou moins poussée pour uniquement deux fractions actives C<sub>125</sub> et C<sub>325</sub> (antibactériens) produites par la souche C25SM.

L'extrait C<sub>325</sub> est un aminoglycoside code 2.2 (selon BERDY) et l'extrait C<sub>125</sub> contient un groupement très particulier P = H en plus du groupement P - S.

## SUMMARY

Our work is concerned with the knowledge and the exploitation biotechnologique of extremophiles microbians resources, which are little or not exploited up to now. We have been interested to the production of antibiotics substances which are elaborated by filamented bacteria (Actinomycetes and metallic bacteria). These have been isolated from a salted and polluted lake: that of El Goléa.

The experimental work and the results have been separated in two parts:

In the first part, we present the methods related to:

- Selective isolations of Actinomycetes founders and parental types.
- The identification of isolated elements, being more particular than other bacteria, it was necessary to study the "ISOMERE" of diaminopimelic acid (D.A.P) of the wall in the cellular hydrolysate to identify 94 founders.

For others, the study with the electronic microscopy has been essential.

The results have shown parental types of 40 isolated elements to *Streptomyces* types, 35 to *Micromonospora* and 19 to *Thermoactinomyces*.

The other 45 founders belonging to other types (*Metallogenium*), their identification was more difficult because their isolation in pure culture is nearly impossible.

The study of the antibiotic activity of all isolated elements have been made, only 30 present an antibacterian activity and/or antifungal in which two founders:

the A125M and C25SM are parentals to metallic bacteria of type *Metallogenium*, these two have an interesting activity:

the first is active with a specific manner against *Candida albicans* and the second antibacterian.

These two founders have been selected for the study of the production of antibiotic substances.

In the second part of our work, we start the production effectively. It consist of:

- the extraction of the products with organic solvent with different polarities.

- make some preliminary tests, in particular, the stability of actives molecules at different temperatures and pH values.

The purifying of molecules with:

- \* chromatography upon thin layer of silice, a method which allow to refer rapidly if a founder produces one or more metabolites, along that, chemical revelations are realised.

- \* chromatography preparatif of silice acid which allow to prepare the first small quantities of products semi-purified.

- \* liquid chromatography at high performance (HPLC) in inverse phase.

The small quantities of antibiotics will be used for the spectroscopy studies (UV visible, IR Infrared).

We have arrived to a characterisation more or less pushed for only two active fractions C<sub>125</sub> and C<sub>325</sub> (antibacterian) produced by the founder C25SM.

The extract C<sub>325</sub> is an aminoglycosid and the extract C<sub>125</sub> contain a gathering very particular P = H in addition to the gathering P - S.



# PLAN

\*\*\*\*\*

## CHAP I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 - LES ANTIBIOTIQUES : CLASSIFICATION.....	1
1.1 Classification des antibiotiques.....	1
1.1.1 D'après leur origine.....	1
1.1.2 D'après leur nature chimique.....	2
1.1.3 D'après leur mécanisme d'action.....	4
1.1.4 D'après leur spectre d'action.....	6
2 - LES ORGANISMES PRODUCTEURS D'ANTIBIOTIQUES.....	6
2.1 Données sur les Actinomycètes.....	12
2.1.1 Généralités.....	12
2.1.2 Biologie des Actinomycètes.....	14
2.1.3 Rôles et importance biotechnologique des Actinomycètes...	18
2.2 Taxonomie des Actinomycètes et genres apparentés.....	20
2.2.1 Identification des familles et des genres d'Actinomycètes.....	20
2.2.2 Taxonomie des genres apparentés et bactéries "filamenteuses" autres qu'Actinomycètes.....	25
3 - METHODES ACTUELLES DE SCREENING.....	28

## CHAP II : PRESENTATION DU SITE D'ETUDE ET CRIBLAGE DES SOUCHES

1 - LE SITE D'ETUDE.....	37
1.1 Situation géographique.....	37
1.2 Données physico-chimiques.....	39
2 - MATERIEL ET METHODES.....	42
2.1 Prélèvement des échantillons.....	42
2.2 Isolement et sélection des souches d'actinomycètes ou genres apparentées.....	43
2.2.1 Milieu d'isolement et agents sélectifs.....	43
2.2.2 Ensemencements et incubation.....	43
2.2.3 Purification et conservation des souches.....	44
2.3 Identification des souches isolées.....	44
2.3.1 Caractéristiques culturelles et micromorphologiques.....	44
2.3.2 Analyse des hydrolysats et des extraits cellulaires.....	45
2.3.3 Mise en évidence des sucres.....	46
2.3.4 Les souches apparentées.....	46
2.4 Etude de l'optimum de salinité.....	47
2.5 Tests d'antibiose.....	49
2.5.1 Microorganismes-cible.....	49
2.5.2 Méthode des disques d'agar.....	51
2.6 Test de l'activité des souches cultivées en milieu liquide.....	51
3 - RESULTATS ET DISCUSSION.....	52
3.1 Analyse physico-chimique des échantillons d'eau.....	52
3.2 Isolement et dénombrement.....	54
3.3 Identification.....	57
3.4 Optimum de salinité.....	61
3.5 Résultats des tests d'antibiose.....	62
3.6 Culture en milieu liquide des souches A125M et C25SM.....	66
4 - IDENTIFICATION DES SOUCHES A125M et C25SM.....	67
4.1 Rappels sur les caractéristiques des deux souches.....	67
4.2 Microscopie électronique à balayage.....	68

**CHAP III : PRODUCTION, EXTRACTION ET PURIFICATION DE DEUX  
ANTIBIOTIQUES SECRETES PAR LES DEUX SOUCHES  
SELECTIONNEES A125M ET C25SM**

1 -	INTRODUCTION.....	80
2 -	MATERIEL ET METHODES.....	81
	2.1 Production d'antibiotiques en milieu liquide.....	81
	2.1.1 Précultures.....	81
	2.1.2 Cultures en fioles agitées.....	81
	2.1.3 Mesure de la production d'antibiotiques.....	81
	2.2 Extraction des antibiotiques.....	82
	2.2.1 Extraction à partir des cellules.....	82
	2.2.2 Extraction à partir du filtrat.....	82
	2.3 Déshydratation de la phase organique, évaporation et vérification de l'activité antibiotique des extraits par antibiographie.....	83
	2.4 Etude de la stabilité des molécules.....	83
	2.4.1 Stabilité en fonction du pH.....	83
	2.4.2 Stabilité à la chaleur.....	84
	2.4.3 Stabilité au cours de la conservation.....	84
	2.5 Séparation et purification.....	84
	2.5.1 Chromatographie analytique sur couche mince (C.C.M) et bioautographie.....	84
	2.5.2 Chromatographie préparative sur plaques épaisses.....	87
	2.5.3 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	88
	2.6 Etudes spectroscopiques des antibiotiques purifiés.....	89
	2.6.1 Etude du spectre ultra-violet (U.V) visible ( $\lambda > 400\text{nm}$ )...	89
	2.6.2 Absorption infra-rouge (I.R) ( $\lambda > 0,8\mu\text{m}$ ).....	89
	2.6.3 Purification ultime de l'extrait C <sub>125</sub> .....	89
3 -	RESULTATS ET DISCUSSION.....	90
	3.1 Production d'antibiotiques en milieu liquide.....	90
	3.2 Extraction de l'activité en milieu liquide.....	93
	3.2.1 Stabilité des molécules actives.....	95
	3.3 Séparation et purification des antibiotiques produits par les souches A125M et C25SM.....	96
	3.3.1 Chromatographies sur couches minces.....	96
	3.3.2 Chromatographies sur couches épaisses.....	102
	3.3.3 Chromatographies par HPLC.....	102
	3.3.4 Conclusion.....	126
	3.4 Etudes spectroscopiques des antibiotiques purifiés.....	126
	3.4.1 Infra-rouge.....	126
	3.4.2 Purification ultime de l'extrait C <sub>125</sub> .....	129
	3.4.3 Interprétation des résultats des études spectroscopiques.....	135
	3.5 Discussion générale.....	138
	CONCLUSION GENERALE.....	144
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	149
	ANNEXES.	

## INTRODUCTION

Les Actinomycètes sont de bons producteurs d'antibiotiques et de composés bioactifs (HUCK et *al*, 1991).

Le genre *Streptomyces* constitue le majeur réservoir des antibiotiques, plus de 10000 découverts jusqu'à ce jour, incluant des antibiotiques très importants en médecine tels que les aminoglycosides, les anthracyclines, le chloramphenicol, les  $\beta$  lactames, les macrolides et les tétracyclines.

La recherche constante de nouvelles molécules d'antibiotiques reste une nécessité pour des raisons bien connues. L'une d'entre elles, et non la moindre, provient de l'augmentation de la fréquence des infections à germes opportunistes depuis le début de l'antibiothérapie, alors que la fréquence des maladies infectieuses classiques causées par des bactéries à pouvoir pathogène, a diminué.

Ceci est également valable pour les molécules à activité antifongique. Ces dernières années, il a été noté une recrudescence de certaines mycoses humaines probablement comme conséquences indirectes de divers traitements chimiothérapeutiques antibactériens, corticoïdes et immunodépresseurs, utilisés amplement à l'heure actuelle. Le nombre de médicaments efficaces et de faible toxicité dont nous disposons actuellement pour traiter certaines mycoses profondes est relativement réduit. De même, le nombre d'antifongiques efficaces et biodégradables utilisables contre les champignons phytopathogènes est assez limité.

A côté de ces quelques substances antifongiques appartenant au groupe des macrolides polyéniques, actuellement utilisées en thérapeutique et qui sont bien connues pour leur toxicité et leur instabilité, il est certain qu'il reste d'autres types de molécules à découvrir biosynthétisées par de nouvelles souches microbiennes particulières, encore non exploitées à ce jour.

Les programmes de screening actuels accentuent l'utilisation de microorganismes extrémophiles qui pourraient avoir des propriétés particulières.

Pour ce faire, le choix du substrat est primordial.

Ces microorganismes ne peuvent coloniser et s'adapter que dans des régions ou des écosystèmes très extrêmes.

Notre présent travail s'inscrit dans cette optique.

Le lac d'El Goléa est le lieu de nos prélèvements, milieu extrême en raison de sa forte salinité et de sa situation géographique particulière.

Notre programme de travail a consisté à:

- 1 - Effectuer des isollements de souches d'Actinomycètes aquatiques ou des souches apparentées qui ont été peu étudiées jusqu'à présent.
- 2 - Sélectionner les souches microbiennes les plus intéressantes du point de vue taxonomique et production de substances antifongiques non polyéniques ou de substances antibactériennes.

Ces deux points seront étudiés dans le chapitre II.

- 3 - Etape de production, à l'échelle du laboratoire, en milieu solide puis en milieu liquide.
- 4 - La mise au point des méthodes d'extraction et de purification des antibiotiques élaborés.
- 5 - Caractérisation partielle des antibiotiques synthétisés.

Ces trois derniers points seront développés dans le chapitre III.

Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique se rapportant aux antibiotiques d'une manière générale et les antibiotiques produits par les Actinomycètes en particulier.

L'importance des Actinomycètes dans ce domaine est appuyée. Nous y évoquerons également les principales méthodes de criblage "screening" pour la découverte de nouveaux antibiotiques et de nouvelles souches.

## CHAPITRE I

# PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 - LES ANTIBIOTIQUES : CLASSIFICATION

Un antibiotique est une substance naturelle, semi-synthétique, doué d'une activité antibactérienne à l'échelon moléculaire, s'exerçant au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques ou d'un équilibre physico-chimique.

L'ère des antibiotiques commence dans les années 30 après la découverte de la pénicilline chez *Penicillium notatum* en 1929 par Fleming et l'isolement de la substance active par Chain et Florey en 1940 puis sa commercialisation en 1942. Plus tard, la production de nouvelles molécules actives est amorcée: Streptomycine, Chlortetracycline, tetracyclines (1944), Spiramycine (1953) etc.

Les antibiotiques peuvent être classés d'après plusieurs critères: origine, nature chimique, mécanisme d'action, spectre d'action et organismes producteurs.

### 1.1 Classification des antibiotiques

#### 1.1.1 d'après leur origine

Les antibiotiques sont issus de diverses sources: bactéries, champignons ou synthèse.

##### \* Bactéries

- Polymyxines, bacitracines produites par le genre *Bacillus*.
- Rifamycines, vancomycines et novobiocine et polyènes produites par un Actinomycète (bactérie mycellienne) du genre *Streptomyces*.

##### \* Champignons

- Penicillines produites par le champignon *Penicillium*.
- Cephalosporines produites par le champignon *Cephalosporium*.

##### \* Synthèse

Imidazole et dérivés et nitrofuranes et quinolones.

Les progrès réalisés dans la taxonomie et l'identification des structures des antibiotiques ont montré qu'il n'y avait aucune relation entre la souche et la production de molécules actives puisqu'une même souche peut produire plusieurs antibiotiques ou vice versa.

L'exemple type est *Streptomyces* qui produit des antibiotiques antifongiques polyéniques et antibactériens (comme les rifamycines, vancomycines).

### **1.1.2 D'après leur nature chimique**

Ce type de classification est le plus adapté.

(BERDY, 1974; BERDY, 1985; BETINA, 1983; ASZALOS, 1987; BERDY et al, 1987; LARPENT et SANGLIER, 1989).

BERDY (1974) et BERDY et al. (1987) proposèrent un système de classification ouvert à tous les antibiotiques qui divise ces derniers en neuf grandes familles chimiques.

Aussi, pour faciliter l'identification des composés et permettre l'élimination des substances déjà décrites, on peut se référer à des banques de données (Handbook of Antibiotics, Part I, II et III) qui contiennent à la fois une classification numérique des antibiotiques facilement informatisable, des caractéristiques physico-chimiques, les organismes producteurs etc ... Chaque antibiotique possède un numéro de code, le 1er chiffre indique la famille (exemple: glucide); le second, la sous famille (exemple: aminoglycoside); le troisième, le groupe (exemple: glycoside - de désoxy - 2 - streptomycine) et le quatrième, le type (exemple: la gentamicine).

\* Antibiotiques contenant des glucides:

- Glucides purs: nojirimycine
- Aminoglycosides: streptomycine, gentamycine.
- N-glycosides: streptothricine et C-glycosides: vancomycine
- Autres dérivés glycosidiques: glycolipides, moénomycine.

\* Lactones macracycliques:

- Macrolides antibiotiques: tylosine, spiramycine.
- Polyènes antibiotiques: amphotéricine, nystatine-méthyl-pentaènes: Filipine, fungichromine
- Autre antibiotiques macrocycliques: nonactine
- Autres antibiotiques macro-lactane: rifamycine.

\* Quinones et antibiotiques apparentés:

- Composés polycycliques linéairement condensés: tétracycline
- Dérivés naphtoquinoniques: anthracycline
- Dérivés benzoquinoniques: mitomycine
- Autres composés: naphtoquinone, actinorhodine.

\* Acides aminés et peptides:

- Dérivés d'acides aminés: cyclosérine, nocardicine, pénicilline
- Homopeptides: bacitracine, hepelcine A, cyclosporine
- Hétéropeptides: aculéacine
- Peptolides: actinomycine, valinomycine
- Peptides à hauts poids moléculaires: subtilisine

\* Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote:

- Hétérocycles non condensés: caerulomycine, milotiomycine
- Hétérocycles condensés: herbicidine, sinéfungine



\* Antibiotiques hétérocycles contenant de l'oxygène:

- Dérivés du furane: aflatoxine
- Dérivés du pyranne: acide kofique
- Dérivés benzo-gamma pyranne: radicinine
- Lactones: patulines
- Polyéthers: momensine, nigéricine

\* Antibiotiques alicycliques:

- Dérivés cyclo-alcane: cycloheximide
- Terpènes: acide macrosmique
- Oligoterpènes: acide fusidique, fusarénone

\* Antibiotiques aromatiques

- Composés benzéniques: chloramphenicol, acide calvatique
- Composés aromatiques condensés: griséofulvine
- Composés non benzéniques: fusariocine C
- Autres dérivés des composés aromatiques: gilvocarcine, novobiocine

\* Antibiotiques aliphatiques:

- Dérivés d'alcane: élaïomycine
- Dérivés des acides carboxyliques aliphatiques: céruléine
- Composés aliphatiques contenant du soufre et du phosphore: phosphonomycine.

### 1.1.3 D'après le mécanisme d'action

Les antibiotiques ont un impact bien précis au niveau de la cellule bactérienne. Ils peuvent ainsi toucher soit la structure, soit la fonction d'une bactérie.

Cette action se déroule à l'échelon moléculaire au niveau du métabolisme.

Les cibles sont caractéristiques de chaque famille d'antibiotiques. Elles ne sont pas toujours connues avec précision et correspondent à six niveaux différents de la cellule bactérienne ou fongique: la paroi, la membrane cytoplasmique, le génome (réplication et transcription du DNA), la traduction du RNAm (synthèse des protéines), le métabolisme respiratoire et le métabolisme intermédiaire.

\* Les antibiotiques actifs sur la synthèse de la paroi

exemple: bêtalactamines , vancomycine.

\* Les antibiotiques altérant la membrane cytoplasmique

altération de structure → polymixines

altération de fonction → polyènes (nystatine)

\* Les antibiotiques actifs sur la synthèse protéique

les aminoglycosides (streptomycine)

les macrolides (erythromycine)

\* Les antibiotiques agissant sur le métabolisme respiratoire

oligomycine , antimycine.

\* Les antibiotiques agissant sur le métabolisme des folates

Exemple : sulfamides.

La cible peut être unique (ADN bactérien) ou multiple, cas de la vancomycine qui agit à la fois sur la paroi, la membrane cytoplasmique et les acides nucléiques.

#### 1.1.4 D'après le spectre d'action

Les antibiotiques se répartissent selon différents spectres.

\* très large

Chloramphenicol actif sur les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> et sur les rickettsies.

Tétracyclines actives sur les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>.

\* large

Les aminosides actifs sur les staphylocoques, Enterobactéries et le bacille pyocyanique.

\* moyen à prédominance sur les bactéries Gram<sup>+</sup>

Erythromycine actif sur les bactéries Gram<sup>+</sup> et les mycobactéries

- \* étroit:
- sur les bactéries Gram<sup>+</sup> : vancomycine
  - sur les bactéries Gram<sup>-</sup> : polymyxine
  - sur les champignons : cycloheximide, amphotericine B et nystatine.

Ce type de classification est très relatif puisque le spectre d'activité est une notion théorique qui dépend de la résistance naturelle des souches dites "sauvages". Elles peuvent acquérir leur résistance à la suite de variations génotypiques dont la fréquence peut augmenter considérablement grâce à la pression de sélection exercée par l'antibiotique au cours de son utilisation chimique, limitant ainsi son spectre initial.

## 2 - LES ORGANISMES PRODUCTEURS D'ANTIBIOTIQUES

Selon Berdy (1985), environ 10.000 antibiotiques d'origine naturelle ont été découverts (Tableau n° 1).

Tableau n°1 : Nombre d'antibiotiques connus d'après Berdy (1985)

Type d'organisme	Antibiotique	
	Quantité	Pourcentage
Bactéries (autres qu'Actinomycètes)	950	9
Actinomycètes	<u>4600</u>	<u>43</u>
Champignons	1600	15
Lichens	100	1
Algues	250	2
Plantes supérieures	2500	23
Animaux	700	7

Les Actinomycètes constituent le principal réservoir d'antibiotiques avec près de 70% des molécules d'origine microbienne, suivis par les *Bacillaceae* et les *Pseudomonadaceae* avec respectivement 7% et 1,3%; d'autres bactéries appartenant à des genres très divers tels que *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Proteus* synthétisent 1,7% des antibiotiques d'origine microbienne (BRETON et *al* , 1989).

De 1930 à 1950, le genre *Bacillus* fût parmi les bactéries, la source la plus importante de nouveaux antibiotiques.

A partir de 1955, *Streptomyces* sera et restera le grand fournisseur de nouveaux antibiotiques.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses équipes de recherche se sont orientées vers des Actinomycètes n'appartenant pas au genre *Streptomyces* (Tableau n°2) (BERDY , 1985).

Tableau n° 2 : Quantités d'antibiotiques isolés des principaux genres  
d'Actinomycetales (BERDY ,1974, 1980, 1984)

Genres	Quantités totales d'ATB découverts		
	En 1974	En 1980	En 1984
<i>Streptomyces</i>	1930	2784	3513
<i>Micromonospora</i>	41	129	270
<i>Nocardia</i>	45	74	107
<i>Actinoplanes</i>	6	40	95
<i>Streptoverticillium</i>	19	41	64
<i>Actinomadura</i>	2	16	51
<i>Saccharopolyspora</i>	0	4	33
<i>Streptosporangium</i>	7	20	26
<i>Actinosynema</i>	0		25
<i>Dactylosporangium</i>	0	4	19

La production d'antibiotiques par des non streptomycètes est un axe de recherche de plus en plus exploité (MOHAN RAO, 1981; DEMAIN et SALOMON, 1985; HOCHLOWSKI et *al*, 1986; KARWOWSKI et *al*, 1986; HACENE, 1992; HACENE et *al*, 1993; HACENE et *al*, 1994; HACENE et *al*, 1995a; HACENE et LEFEBVRE, 1996).

Parmi les Actinomycètes rares, certains sont plus rares que d'autres; le sol est plus riche en souches de *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Actinomadura* et *Nocardia* qu'en d'autres Streptomycètes (DEMAIN et SALOMON, 1985).

Le tableau n° 3 donne une estimation des antibiotiques produits par des Actinomycètes rares entre 1975 et 1982. Généralement, les antibiotiques produits par les microorganismes se présentent sous forme d'une famille de substances, par exemple un Actinomycète produit rarement une actinomycine mais une série d'actinomycines présentes en composés majeurs ou en composés mineurs.

Dans le tableau n° 3, nous notons que le nombre d'antibiotiques produit par les Actinomycètes rares est très bas: ceci s'explique par le fait que lorsqu'une souche quelconque produit plus d'un antibiotique, la famille d'antibiotiques est comptée comme 1. Par exemple, en 1986, HOCHLOWSKI et *al* ont isolé les tiacumicines produites par l'espèce *Dactylosporangium aurantiacum*; KARWOWSKI et *al* ont décrit durant la même année les arizonines produites par l'espèce *Actinoplanes arizonaensis* et McALPINE et *al* ont isolé les macquarimicines produites par le genre *Micromonospora* et enfin des souches termophiles du genre *Thermomonospora* produisant la naphtaquinone Sch 38S19 reportées par HEDGE et *al* en 1986.

Tableau n° 3 : Estimation du nombre d'antibiotiques ou familles d'antibiotiques produits par les Actinomycètes entre 1975-1982 d'après Journal of antibiotics (1975-1982) et Berdy et *al* (1980-1981)

Genre	Nombre d'antibiotiques	Principaux types d'antibiotiques reportés
<i>Actinomadura</i>	16	4 anthracyclines 3 polyethers
<i>Actinoplanes</i>	43	5 vancomycines 4 polyènes 18 peptides
<i>Actinosporangium</i>	6	6 anthracyclines
<i>Actinosynnema</i>	7	2 ansamycines
<i>Ampullariella</i>	2	
<i>Chainia</i>	3	
<i>Dactylosporangium</i>	3	2 aminoglycosides
<i>Kitasotosporia</i>	1	
<i>Kitasotoa</i>	1	quinoline dérivative
<i>Microellobosporia</i>	1	thiazolyl peptide
<i>Micromonospora</i>	65	36 aminoglycosides 5 macrolides 8 peptides 4 nucléosides acide acyltetramique dérivative
<i>Microtetraspora</i>	1	5 ansamycines
<i>Nocardia</i>	15	
<i>Nocardiopsis</i>	2	2 peptides
<i>Pseudonocardia</i>	2	
<i>Rhodococcus</i>	2	vancomycine type
<i>Saccharomonospora</i>	1	2 aminoglycosides
<i>Saccharopolyspora</i>	3	
<i>Streptoalloteichus</i>	2	5 peptides
<i>Streptosporangium</i>	9	3 aminoglycosides
<i>Streptoverticillium</i>	22	5 polyènes 4 peptides 1 alcaloïde
<i>Thermoactinomyces</i>	1	
<i>Thermomonospora</i>	1	
<i>Indéfinis</i>	2	
<b>TOTAL</b>	<b>211</b>	
<i>Streptomyces</i>	<b>600</b>	



*Ampullariella regularis* A11079 est rapportée entre 1979 et 1981 comme produisant des nucléosides heplanocines A, B, C et F, dans le tableau n°3; ceux-ci sont comptés comme un antibiotique complexe.

Il est à noter que pour les Actinomycètes rares, 200 antibiotiques ont été produits durant les années 1975-1982, par contre, les Streptomycètes ont en produits 600.

CRAWDALL et HAMILL en 1986 rapportent les majeures classes structurales produites par le genre *Streptomyces* (ansamycines, anthracyclines, quinones,  $\beta$ lactames, nucléosides, peptides).

## 2.1 Données sur les Actinomycètes

### 2.1.1 Généralités

Les Actinomycètes appartenant à l'ordre des actinomycétales sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, prenant généralement le Gram et sont abondamment distribuées dans la nature.

Les Actinomycètes sont importants pour leur rôle dans la synthèse de composés complexes (antibiotiques, vitamines, stérols), la fertilisation des sols, la détermination des maladies humaines et animales (MARIAT et SEBALD, 1982) (tableau n°4) ainsi que des maladies des végétaux et la détérioration des aliments. Selon MARIAT et SEBALD (1970), ils dégradent activement la matière organique.

Ils ont été souvent été confondus avec les champignons en raison de la symptomatologie des maladies qu'ils provoquent proche de celle des champignons et de leur morphologie (fongoïde, hyphes ramifiés et formation de spores).

Tableau n° 4 : principales maladies humaines ou animales dues à des

Actinomycètes

d'après MARIAT et SEBALD, (1982)

Nom de la maladie	Organes affectés	F.Parasitaires	Hôte	Germes en cause
- Actinomycose	région cervico-faciale; cavité orale; f.viscérales secondaires	grains jaunes	homme  animal	<i>A.israelii</i> <i>A.naeshudii</i> <i>A.eriksonii</i> <i>Arachnia propionica</i>  <i>A.bovis</i>
- Mycetomes actinomycosiques	extrémités et membres surtout tissus osseux et/ou s.cutané; métastases rares	grains jaunes durs grains rouges grains blancs à blancs rosés ou petits grains	homme très rarement animal	- <i>S.somaliensis</i> - <i>Actinomadura pelletieri</i> - <i>Actinomadura madurae</i> - <i>N.brasiliensis</i> - <i>N.astéroïdes</i>
- Nocardiose	poumons; f.cutanées cérébrales et disséminées secondaires	filaments isolés	homme animal parfois	- <i>N.astéroïdes</i>
- Pneumopathies allergiques	syst.respiratoire	----	homme	- <i>Micropolyspora faeni</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
- Streptotrichose	épiderme et derme	filaments nombreuses f.coccoïdes	animal homme rarement	<i>Dermatophilus congolensis</i>

\* *A:Actinomyces* ; *S:Streptomyces* ; *N:Nocardia*

Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les rangent parmi les procaryotes:

- Structure cellulaire procaryote.
- Flagelles éventuels.
- Sensibilités aux antibiotiques antibactériens et résistance aux antifongiques.
- Absence de stéroïdes dans les membranes.
- Paroi cellulaire contenant un peptidoglycane.

Tous ces caractères confirment leur classification parmi les bactéries.

### **2.1.2 Biologie des Actinomycètes**

D'après WILLIAMS et *al* (1984), les Actinomycètes sont rencontrés sur une grande variété de substrats naturels.

Le sol constitue le réservoir le plus riche, à partir duquel ces microorganismes peuvent coloniser de nombreux biotopes (fumiers, composts, fourrages, grains, air).

Selon McCARTHY et WILLIAMS (1990), le caractère ubiquitaire des Actinomycètes saprophytes dans l'environnement est dû à deux facteurs essentiels:

- la diversité métabolique.
- l'évolution des mécanismes spécifiques pour la dispersion.

Comme il est précisé dans le tableau n°5.

Tableau n° 5 : Majeurs habitats de taxa d'Actinomycètes

McCARTHY et WILLIAMS (1990)

Taxon	habitats
<i>Actinoplanes</i>	- eau fraîche, litière des plantes, sol
<i>Frankia</i>	- nodules de racines des non légumineuses
<u><i>Micromonospora</i></u>	- <u>eau fraîche</u> , sédiment, sol humide
<i>Nocardia amarae</i>	- boues des égouts
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	- eau, sol, crottes d'animaux
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	- "Self-Heaten bagasse"
<i>Saccharopolyspora redivirgula</i>	- foin moisi
<u><i>Streptomyces</i></u>	- sol, litière des plantes, <u>eau</u>
<i>Thermoactinomyces</i>	- composts, fourrage moisi et autres matériaux chauds

- Les Actinomycètes non aquatiques

Les Actinomycètes constituent une proportion significative de la population microbienne de la plupart des sols. Ils peuvent excéder 1million/gramme de terre sèche. Ces derniers constituent le réservoir le plus riche des différents isolats dont la majorité produit des antibiotiques ou autres métabolites *in vitro* (McCARTHY et WILLIAMS, 1990); 90% des Actinomycètes ont été isolés du sol (Tableau n° 6).

LECHEVALIER et LECHEVALIER (1967) estiment, après une étude de 5000 isolats issus de 16 sols différents, que plus de 95% des Actinomycètes rencontrés sont en fait des *Streptomyces*.

Les autres genres semblent moins importants du fait qu'ils ne se développent pas selon les méthodes classiques d'isolement mais uniquement par des techniques très sélectives.

Certains facteurs tels que: la nature et l'abondance des matières organiques, la profondeur, le pH ainsi que l'humidité et l'aération influencent la croissance et la distribution des Actinomycètes dans le sol.

Tableau n°6 : Présence et isolement des différents genres dans le sol  
Bergey's Manual (1989)

Genre	Commentaires	Référence de la procédure d'isolement
<i>Actinomadura</i>	Rare mais possibilités sous-estimées	Meyer (1989)
<i>Actinoplanes</i>	Occasionnellement retrouvé dans un large éventail de sols	Palleroni (1989)
<i>Dactylosporangium</i>	Rare mais retrouvé dans une variété de sols du monde	Vobis (1989)
<i>Frankia</i>	Evidence limitée en dehors des nodules	Lechevalier et Lechevalier (1989)
<i>Geodermatophilus</i>	Rare mais types d'habitats: désert du mont Everest	Luedemann et Fonesca (1989)
<i>Glycomyces</i>	Colonies très petites et croissance lente	Labeda (1989)
<i>Kibdelosporangium</i>	Isolé il y a longtemps mais les colonies ressemblent à <i>Streptomyces</i> et <i>Nocardia</i>	Shearer et al (1989)
<i>Kitasatospora</i>	Isolé il y a longtemps mais les colonies ressemblent à <i>Streptomyces</i>	Omura et al (1989)
<i>Microbispora</i>	Isolé d'échantillon de sol sec ayant subi des prétraitements	Nonomura (1989)
<i>Micromonospora</i>	Commune dans tous les sols particulièrement le moisi	Kawamoto (1989)
<i>Nocardia</i>	Entièrement commune: freq: $10^4/g$ → méthodes sélectives	Goodfellow et Lechevalier (1989)
<i>Rhodococcus</i>	Beaucoup d'espèces communes et isolées il y a longtemps	Goodfellow (1989)
<i>Streptomyces</i>	Genre dominant dans tous les sols	Williams et al (1989)
<i>Streptosporangium</i>	Tout à fait commun: $10^6/g$ → sol sec traité à la chaleur	Nonomura (1989)
<i>Streptoverticillium</i>	Isolé dans un large éventail de sols mais rarement en grand nombre	Locci et Schofield (1989)

## - Actinomycètes des eaux douces et milieu marin

(environnement aquatique)

Les Actinomycètes ne se développent pas dans des habitats aquatiques. Néanmoins, ils sont présents dans les fonds fluviaux ou lacustres, milieu marin ainsi que dans les sédiments.

La diversité taxonomique rencontrée est comparable à celle du sol, et selon McCARTHY et WILLIAMS (1990), les isolats sont simplement le résultat d'un "Wash in". La colonisation normale du milieu marin par les Actinomycètes est un point controversé.

Selon les uns dont WEYLAND (1981), il existerait une flore d'Actinomycètes spécifique aux sédiments marins, caractérisée par une température optimale faible, l'halophilie et la barotolérance.

Pour d'autres GOODFELLOW et HAYNES (1983), les Actinomycètes isolés de ces milieux correspondraient à des souches terricoles adaptées à la salinité marine.

### **2.1.3 Rôles et Importance biotechnologique des Actinomycètes**

#### - Rôle dans la nature:

Les Actinomycètes ont des rôles néfastes et utiles dans la nature.

Parmi leurs attributs négatifs, nous pouvons citer les pathologies qu'ils génèrent chez l'être humain, animaux et végétaux. Leurs spores polluent l'environnement causant des allergies.

Ils sont également responsables de pollution affectant essentiellement les qualités organoleptiques des eaux de consommation.

Ils sont aussi extrêmement actifs dans la biodétérioration et la biodégradation.

Parmi ces bactéries, nombreuses sont celles pouvant détériorer les molécules et les polymères les plus récalcitrants non altérés par les autres organismes (LACEY, 1988).

En ce qui concerne leurs rôles bénéfiques:

Il est indéniable que certains genres jouent un rôle important dans les phénomènes de biodégradation et bioconversion. Ainsi, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* se révèlent être d'une grande importance dans l'utilisation et la dégradation de nombreux hydrocarbures (alcanes, huiles, benzène, kérosène) souvent à l'origine de pollution grave.

GOODFELLOW et CROSS (1984) et HIRSCH et McCORMICK (1985) signalent que de nombreux actinomycètes thermophiles et mésophiles produisent des cellulases, xylanases, amylases, protéases et ligninases, capables de bioconvertir les lignocelluloses des graminées et du bois.

En particulier: *Thermomonospora* et *Microbispora* et *Streptomyces* mésophile. Ils pourraient intervenir dans la lutte biologique contre la fusariose du Palmier dattier. Ils ont un rôle majeur selon GOODFELLOW et WILLIAMS (1983) dans la rhizosphère: suppression de racines pathogènes. Ils libèrent des métabolites secondaires très utiles pour l'agriculture: insecticides, herbicides, antithelminthiques. Certains genres tels que *Frankia* possèdent selon PIRET et DEMAIN (1988) la capacité de fixer l'azote.



## 2.2 Taxonomie des Actinomycètes et genres apparentés

La classification des Actinomycètes est en remaniement continu depuis près de 40 ans.

En 1964, une étude internationale, en collaboration intitulée "International Streptomyces Project" (I.S.P), a été entreprise pour évaluer les caractères taxonomiques (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966).

En 1989, WILLIAMS édite le volume 4 de la 9<sup>ème</sup> édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" où la taxonomie numérique tient une place relativement privilégiée.

Cette technique consiste à comparer différentes souches avec le maximum de paramètres et d'établir des coefficients de similarité.

Cependant, les clés de détermination les plus couramment utilisées restent actuellement celles du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>ème</sup> édition.

### 2.2.1 Identification des familles et des genres d'Actinomycètes

Les principaux caractères utilisés pour différencier les familles et les genres sont surtout d'ordre morphologique et chimique. Pour déterminer la famille d'appartenance d'une souche d'actinomycète, les principaux critères morphologiques sont:

- la présence ou non d'un mycelium vrai.
- la production ou non d'un mycelium aérien.
- la fragmentation ou non de mycelium végétatif.
- la production ou non de structures spéciales comme les sporanges, sclérotés, zoospores.

A ces critères morphologiques, s'ajoutent d'autres chimiotaxonomiques: l'examen de la composition en acides aminés et en glucides caractéristiques des enveloppes cellulaires.

L'acide diamino 2,6 pimélique (D.A.P) est l'acide aminé le plus important pour la classification des Actinomycètes.

Suivant sa forme LL, méso ou hydroxylée, cet acide aminé va permettre de distinguer les *Streptomycetaceae* dont tous les genres possèdent une paroi contenant l'isomère LL-DAP, des autres familles d'actinomycètes. Par ailleurs, cette famille contient également de la glycine mais aucun sucre caractéristique.

Ce type de profil correspond aux parois de type I. Trois autres types de parois permettent de différencier les familles et les genres d'*Actinomycetales* (Tableau n° 7).

Tableau n°7 : Principaux types de parois rencontrés chez les  
Actinomycétales  
(GOTTLIEB, 1974)

	PAROI DE TYPE			
	I	II	III	IV
<b>ACIDES AMINES</b>				
méso-DAP	-	+	+	+
LL-DAP	+	-	-	-
Glycine	+	+		
<b>SUCRES</b>				
Arabinose	-	+	-	+
Galactose	-	-	-	+
Xylose	-	+	-	-
Madurose	-	-	+ ou -	-
<b>FAMILLES</b>	<u>Streptomycetaceae</u>	<u>Micromonosporaceae</u>	<u>Micromonosporaceae</u>	<u>Micromonosporaceae</u>
<b>(GENRES)</b>	( <i>Streptomyces</i> , <i>Streptoverticillium</i> <i>Microellobosporia</i> <i>Sporichthya</i> )	( <i>Micromonospora</i> ) <u>Actinoplanaceae</u> ( <i>Actinoplanes</i> , <i>Ampullariella</i> , <i>Dactylosporangium</i> )	( <i>Microbispora</i> , <i>Actinobifida</i> , <i>Thermoactinomyces</i> ) ( <u>Actinoplanaceae</u> ) ( <i>Spirillospora</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Streptosporangium</i> ) <u>Dermatophilaceae</u> ( <i>Dermatophilus</i> , <i>Geodermatophilus</i> )	( <i>Thermonospora</i> , <i>Micropolyspora</i> ) ( <u>Mycobacteriaceae</u> ) ( <i>Mycobacterium</i> ) ( <u>Nocardiaceae</u> ) ( <i>Nocardia</i> , <i>Pseudonocardia</i> )

Tous ces critères morphologiques et chimiotaxonomiques enregistrés permettent alors d'effectuer une recherche de type dichotomique afin d'identifier la famille et le genre d'appartenance de la souche étudiée (Tableau n°8).

Dans la dernière édition du Bergey's Manual, d'autres critères chimiotaxonomiques sont utilisés pour la détermination des genres d'Actinomycètes.

Il s'agit de la composition de l'organisme en lipides (acides gras, menaquinomes, lipides polaires et acides nucléiques).

- Les acides gras:

Les acides gras les plus communs chez les Actinomycètes appartiennent soit à un groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de Carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de C.

- Les menaquinones:

Elles sont classées en fonction du nombre d'unités isoprènes et du nombre de doubles liaisons.

Dans le groupe des genres dont les parois contiennent du LL-DAP, le genre *Streptomyces* synthétise principalement du MK-9 (H6).

- Les lipides polaires:

Les plus courants chez les Actinomycètes sont les phospholipides.

- Les acides nucléiques:

Les Actinomycètes sont caractérisés par un G+C% élevé, supérieur à 55% (Coefficient de CHARGAFF).

(69 à 78% pour le genre *Streptomyces*).

. le taux d'hybridation ADN ou ADN ou ADN-ARN (MORDASKI, 1985);

. la séquence de l'ARN<sub>r</sub>16S (FOWLER et *al*, 1985)

C'est la méthode la plus utilisée actuellement.

Tableau n°8 : Clé d'identification des familles d'Actinomycétales

(GOTTLIEB , 1974)

→ **Absence de mycelium vrai**

→ Pas d'acido-alcool-résistance,  
la plupart ne contiennent pas Actinomycetaceae  
d'acide 2.6 aminopimelique dans leurs  
parois

→ Acido-alcool-résistance lors de certaines Mycobacteriaceae  
phases de croissance, paroi de type IV

→ **Présence de mycelium vrai**

→ Formes symbiotiques chez les plantes Frankiaceae  
(nodules)

→ Formes saprophytes ou parasites facultatives  
→ Spores formées à l'intérieur des sporanges Actinoplanaceae  
→ Spores non formées à l'intérieur des sporanges

→ mycelium végétatif fragmenté formant des  
éléments coccoïdes mobiles, mycelium Dermatophilaceae  
généralement absent, paroi de type III

→ mycelium végétatif couramment fragmenté  
donnant des éléments coccoïdes ou Nocardiaceae  
oblongues habituellement non mobiles,  
paroi de type IV

→ mycelium végétatif non fragmenté,  
mycelium aérien abondant, formant de Streptomycetaceae  
longues chaînes de spores, paroi de type I

→ mycelium végétatif non fragmenté, formation  
de simples, doubles ou en courtes chaînes Micromonosporaceae  
sur le mycelium primaire ou secondaire,  
parois de type II, III ou IV → genre

Néanmoins, actuellement, le concept des espèces chez beaucoup de genres d'Actinomycètes est encore faiblement compris et donc l'évaluation des souches de ces genres par les techniques taxonomiques, classiques, numériques et moléculaires sont nécessaires pour clarifier cette situation.

GOODFELLOW et *al* (1990) ont utilisé la classification chimique et numérique sur 68 isolats appartenant au genre *Actinoplanes* isolés des sédiments d'eau. Ils ont été comparés à travers 89 caractères avec des souches marquées du genre *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora* et *Streptosporangium*.

### 2.2.2 Taxonomie des genres apparentés et bactéries "filamenteuses" autres qu'Actinomycètes

#### - Genres apparentés

La 9<sup>ème</sup> édition (1994) du Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology, le groupe 29 (Other Genera) comprend 3 genres dont les caractéristiques morphologiques et chimiotauxonomiques ne permettent pas de les classer dans un groupe bien précis de genres d'Actinomycètes. Mais ils ont deux propriétés en commun:

- production de longues chaînes de spores sur le mycelium aérien
- absence d'acide mycolique dans l'enveloppe cellulaire.

Les cellules sont aérobies, chimoorganotrophes et sont isolées du sol.

#### - Bactéries "filamenteuses" autres qu'Actinomycètes

Nous nous sommes intéressés à ce groupe de bactéries car elles sont peu étudiées et exploitées.

Dans la dernière édition (1994) du Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology, elles sont classées dans le groupe 12 : bactéries

chimolithotrophes aérobies et organismes associés et Sousgroupe 2 :  
Bactéries oxydant et/ou déposant du fer et du manganèse.

I - Bactéries qui déposent des oxydes de fer ou de manganèse à l'extérieur de la cellule:

A - Cellules sans "appendages"

exemple des genres: *Thiobacillus*, *Leptospirillum*.

B - Cellules avec appendages

Le genre *Gallionella*, les oxydes de métaux sont déposés entre les filaments (tiges).

une seule espèce: *Gallionella ferruginea*.

C - Cellules sans appendages déposant le fer ou le manganèse sur la surface de la cellule.

la famille: "Siderocapsaceae".

II - Organismes ne possédant pas de paroi reconnue, déposant les oxydes de manganèse en forme d'"araignées".

A - Les oxydes de manganèse sont déposés dans des filaments qui irradient du centre.

Genre: *Metallogenium*.

Deux espèces: - *Metallogenium personatum*

- *Metallogenium symbioticum*

B - les oxydes de manganèse sont déposés dans des feuillets plats.

Genre: *Caulococcus*.

C - Les oxydes de manganèse sont déposés comme

Genre: "*Kusnezovia*".

Ces organismes ont diverses morphologies dont la plupart forment des agrégats (filaments, capsules) aisément reconnaissables par leur coloration due aux oxydes de fer et de manganèse.

C'est un groupe de bactéries, du point de vue écologique, très important, où la plupart des bactéries sont non cultivables, classées principalement sur la base de la morphologie.

Ces bactéries sont de Gram variable ou dépourvues de paroi.

Les oxydes de métaux sont observés au microscope optique, constituant l'ultime caractère assignant ces bactéries dans ce groupe.

La quasi-totalité des bactéries sont microaérophiles.

Les bactéries métalliques ont trois biotopes différents, chacun s'accordant avec la stabilité du domaine  $E_h$ -pH de  $Fe^{2+}$ :

a) chimiolithotrophes acidophiles à  $E_h \nearrow$  et pH  $\searrow$  oxydant des sulfures dans les eaux minières.

b) microaérophiles, chimiolithotrophes et organotrophes à  $E_h$  modéré, à pH neutre, qui sont représentées principalement par des bactéries aquatiques se développant soit dans des régions "Chemocline" ou à la surface de sédiments et dans les eaux contenant des métaux.

c) les chimioorganotrophes décomposant des composés organiques (Fe) à  $E_h \nearrow$  et pH neutre ("Siderocapsaceae").

Nous nous intéresserons en particulier à certains genres: *Gallionella*, *Metallogenium*, *Ochrobium*, *Caulobacter*.

PRINGSHEIM, en 1948, reporte tout l'historique de ces bactéries qu'il nommait bactéries métalliques (Iron Bacteria).

Selon lui, les premières études sur ces bactéries ont débuté en 1833 par KUTZING sur l'espèce *Sphaerotilus natans*.



Quant à leur position taxonomique, PRINGSHEIM précise que le terme bactéries métalliques a un sens biologique plutôt que taxonomique. D'autres organismes métalliques ayant à peu près la même relation avec le fer (et manganèse) sont retrouvés dans différents groupes spécialement les Cyanophyceae, Chrysophyceae, Bikosoecaceae, Englenineae (PRINGSHEIM, 1948). Néanmoins, leur position taxonomique a une relation étroite avec cette capacité biochimique.

C'est un groupe de bactéries très particulier qui, à un certain stade, forment des filaments (tiges). La nature de ces filaments, dans la plupart des cas, est inconnue (HENRICI, 1939).

PRINGSHEIM souligne la difficulté d'obtenir des cultures pures de bactéries métalliques. Leur métabolisme, leurs enzymes, leur respiration sont complètement inconnues.

### **3 - MÉTHODES ACTUELLES DE SCREENING**

Pour les microorganismes isolés sélectivement, la production de métabolites antimicrobiens est une propriété banale.

Une question qui se pose donc: Comment agir pour isoler de nouvelles molécules?

Selon DESHAYES et *al* (1984), sur plus de 6000 molécules décrites à ce jour, moins de 100 molécules ont fait l'objet d'une commercialisation en thérapeutique humaine et vétérinaire.

Par conséquent, les méthodes classiques doivent être reprises afin de créer un équilibre entre les résultats de manipulation des microorganismes et les efforts de recherches consentis, ceci d'une part, et d'autre part, c'est un moyen d'optimisation.

L'efficacité d'un programme de criblage (Screening) dépendra de trois critères essentiels:

- Choix des organismes producteurs.
- Choix des cibles recherchées.
- Choix des méthodes analytiques.

DESHAYES et *al* (1984) proposent un modèle de stratégie de criblage (figure n° 1).

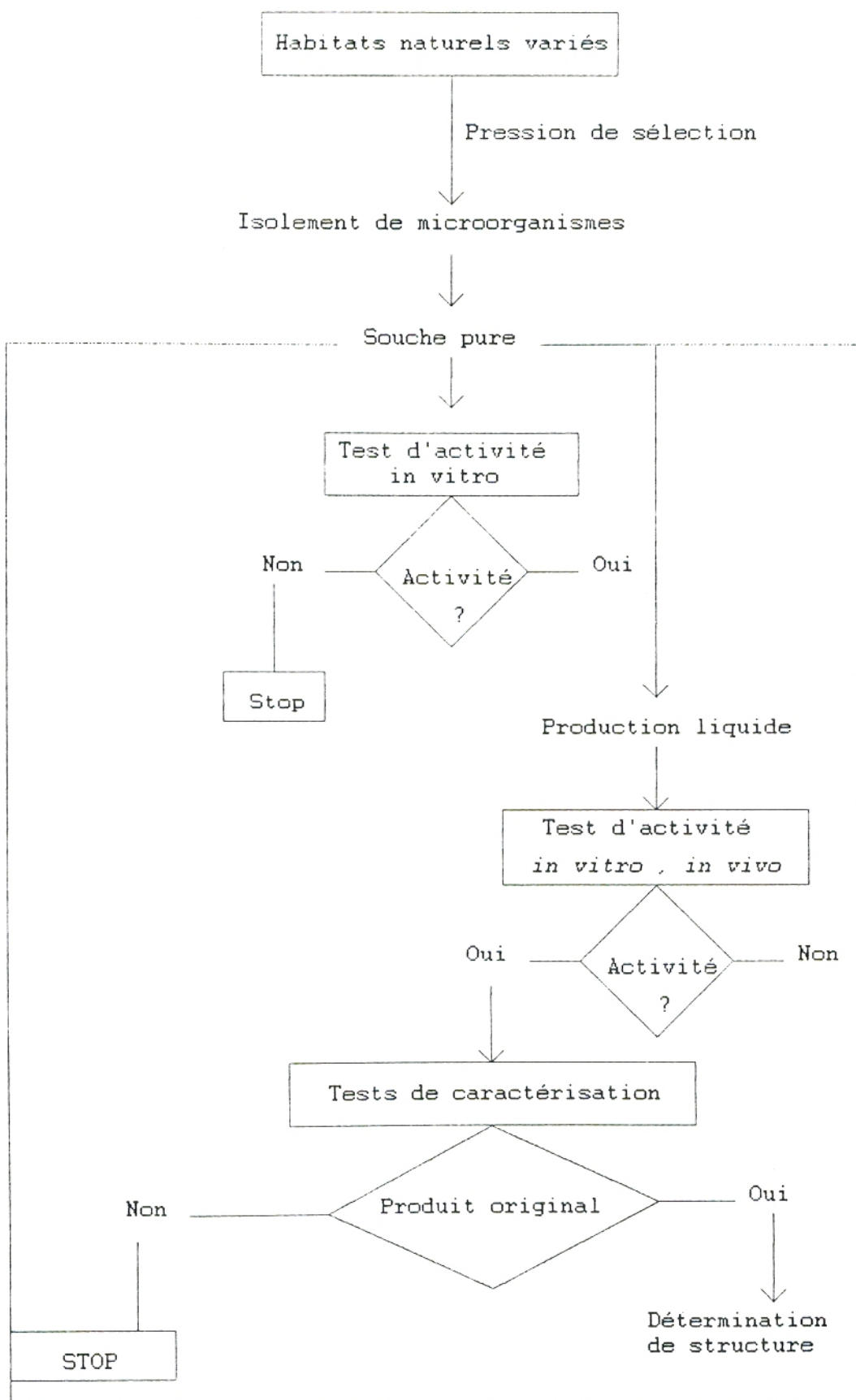


Figure n°1 : Stratégie de Screening (DESHAYES et *al*, 1984)

Le criblage primaire permet la détection et l'isolement de microorganismes ayant des potentialités pour des applications industrielles.

Selon NAKAYAMA (1981), NOLAN et CROSS (1988), les caractéristiques idéales d'un screening primaire sont comme suit:

- Rapide → Prévoyant
- Sensible → Manipulation facile des différents échantillons
- Pas onéreux → Effectif pour une large gamme de composés  
(mais spécifique pour la cible)

Dans le cas de la production, le criblage primaire consiste à tester *in vitro* l'activité antibiotique des souches sélectionnées, sur milieu solide en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition observée après incubation.

Cette technique est dite A.P.M (agar piece method) ou agar plug (figure n° 2).

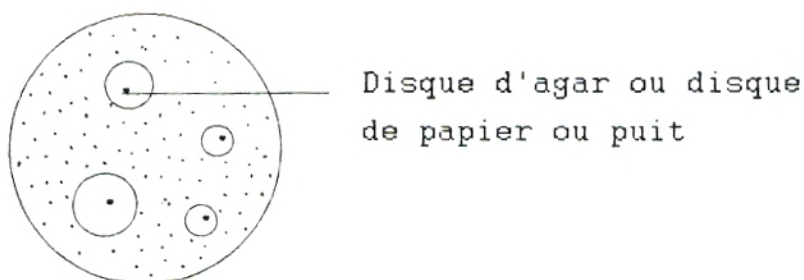


Figure n° 2 : Agar-Piece-Method  
(A.P.M)

Les germes tests utilisés dans le cadre de cette technique doivent être choisis avec soin.

NAKAYAMA (1981) propose une palette de microbes comme souches-cible (tableau n° 9).

Tableau n°9 : Screen antimicrobien initial typique

NAKAYAMA (1981)

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Sarcina lutea</i>	<i>Bordetella branchiseptica</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
<i>Saccharomyces pastorianes</i>	<i>Bacillus subtilis sur agar minimum</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>E.coli sur agar minimum</i>
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Bactéries sensibles aux flactames</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Bactéries résistantes aux amino- glycosides ou autres antibiotiques</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Escherichia coli</i>	

Par exemple, *Bordetella branchiseptica* est un genre qui intéresse la médecine vétérinaire et *Pseudomonas solanacearum* est pathogène vis à vis des plantes.

Un screening secondaire qui suit habituellement le primaire a comme double objectif:

- d'obtenir une production en culture liquide,
- et d'examiner les activités dans une série de tests complémentaires *in vitro* et/ou *in vivo*.

A ce stade, seuls les microorganismes ayant une potentialité réelle dans les processus industriels sont retenus.

NAKAYAMA (1981), dans la figure n°3, schématise le cheminement d'un produit de fermentation issu d'un microorganisme isolé, jusqu'à sa commercialisation pour justifier et expliquer le temps et le coût de l'opération.

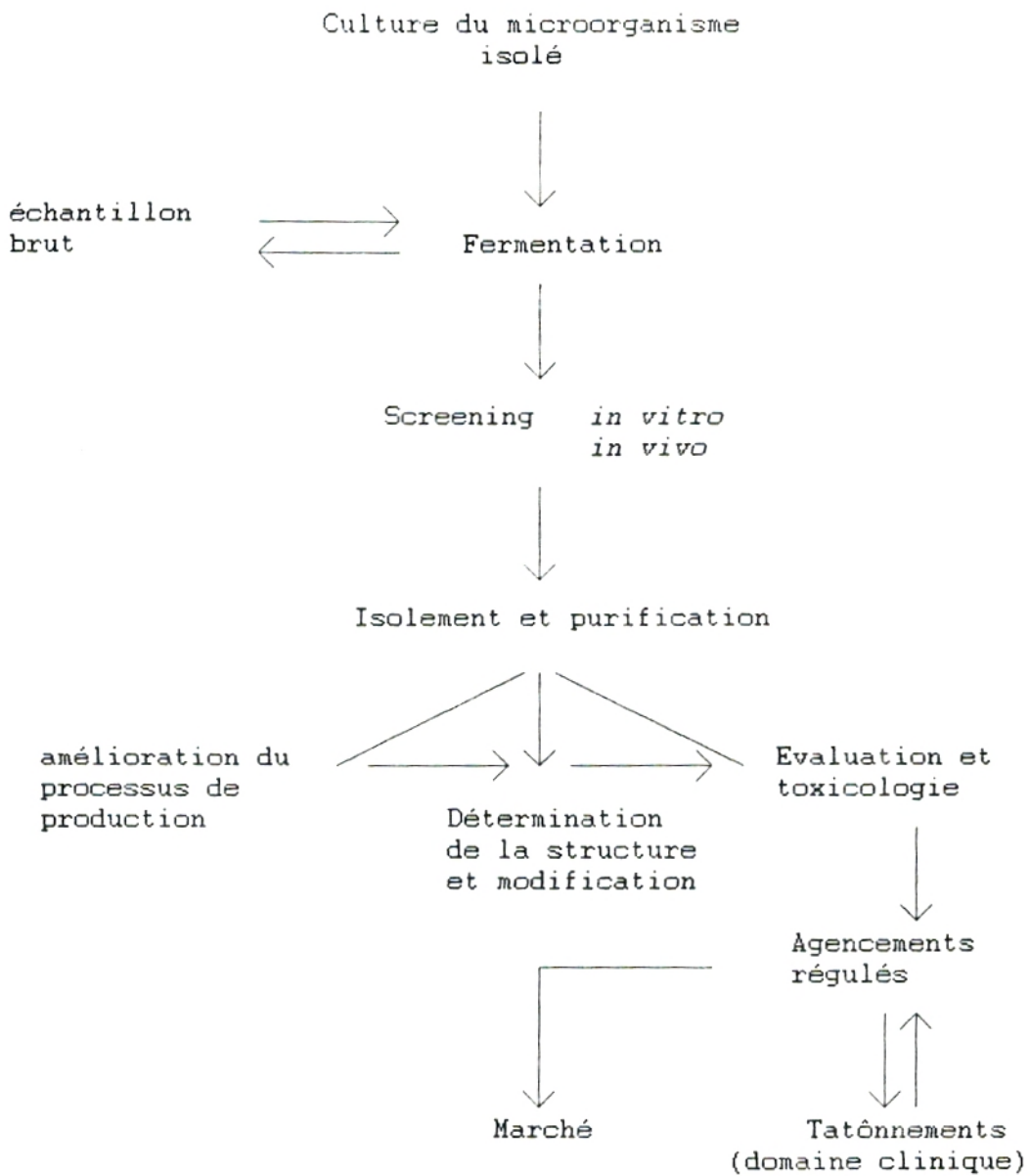


Figure n° 3 : Chemin suivi par un produit de fermentation  
vers la place du marché  
(NAKAYAMA, 1981)

En résumé, le screening secondaire comporte les étapes suivantes:

- Identification préliminaire du microorganisme sélectionné.
- Préparation de l'échantillon brut.
- Identification du composé (produit de fermentation).

Différentes techniques: - méthodes chromatographiques

(HPLC, TLC, chromatographie sur papier)

- méthodes physicochimiques

(Ultra-Violets, Infra-Rouge, Résonance  
Magnétique Nucléaire, Spectre de Masse, ...)

- Evaluation (pour éliminer les antibiotiques très toxiques).

Ces dernières années, les criblages classiques ont été additionnés de screens supplémentaires, notamment pour les antibiotiques actifs contre les bactéries anaérobies et les antibiotiques antifongiques et les substances antivirales.

Les stratégies courantes pour la recherche de métabolites microbiens bioactifs ont été développés à partir du milieu des années 70.

Plusieurs auteurs ont publié sur ces nouvelles voies (criblage orienté) (FLECK, 1974; NAKAYAMA, 1981; NISBET, 1982 et OMURA, 1986; HACENE et *al*, 1994a).

Actuellement, les stratégies de screening moderne emploient différentes disciplines pour une production optimisée des métabolites. Ainsi, il y a une approche écologique et génétique pour les microorganismes producteurs.

Les souches sont ensuite préservées et stockées dans des conditions leur permettant une stabilité génétique.

L'étape finale consiste dans l'optimisation de la production du métabolite comme il a été décrit au préalable (NISBET, 1982).



L'utilisation de techniques moléculaires afin d'étudier la biosynthèse des antibiotiques pour optimiser la production est reportée pour l'isolement des clones de *Streptomyces hygroscoapiens* producteurs de Geldanamycines et également pour la Kirromycine (Facteurs d'élongation).

Sur le plan physiologique, la relation entre le métabolisme de la proline et la régulation du Carbone de la spiramycine est également reportée (ALDERSON et *al*, 1993).

La réussite d'un programme de criblage comme le souligne OMURA (1986), repose sur un comportement philosophique du chercheur vis à vis des microbes.

## CHAPITRE II

# PRESENTATION DU SITE D'ETUDE ET CRIBLAGE DES SOUCHES

## 1 - LE SITE D'ETUDE

### 1.1 Situation géographique

Le lac d'El Goléa constitue le lieu de nos prélèvements afin d'étudier la flore d'Actinomycètes ou bactéries apparentées existante au sein de ce lac.

Il a été choisi en raison de sa forte salinité et sa situation géographique.

Il se situe au sud de la ville d'El Goléa, qui compte environ 10000 hectares, s'étendant sur une longueur de 7 à 8 Km (Figure n° 4).

Il est alimenté par:

- les eaux domestiques.
- les eaux de drainage de la palmeraie.
- les eaux de pluie qui sont très faibles (moins de 100mm/an).

Ce lac a été subdivisé en quatre stations selon le degré de pollution, le niveau d'eau et la concentration en sel (salinité).

\* Les stations I et II sont les plus polluées car elles reçoivent en premier les rejets de la ville.

\* La station III est moins polluée.

\* Enfin, la station IV est la Sebkhia proprement dite; elle est sèche de Juin à Septembre à cause de l'évaporation d'eau pendant cette période.

Les deux facteurs pollution et salinité exercent une forte pression de sélection sur la microflore, permettant une sélection naturelle de souches particulières.

L'optique de notre travail se situe dans cet axe, en l'occurrence la connaissance de cette microflore particulière qui héberge ce milieu extrême en vue d'exploitation biotechnologique.

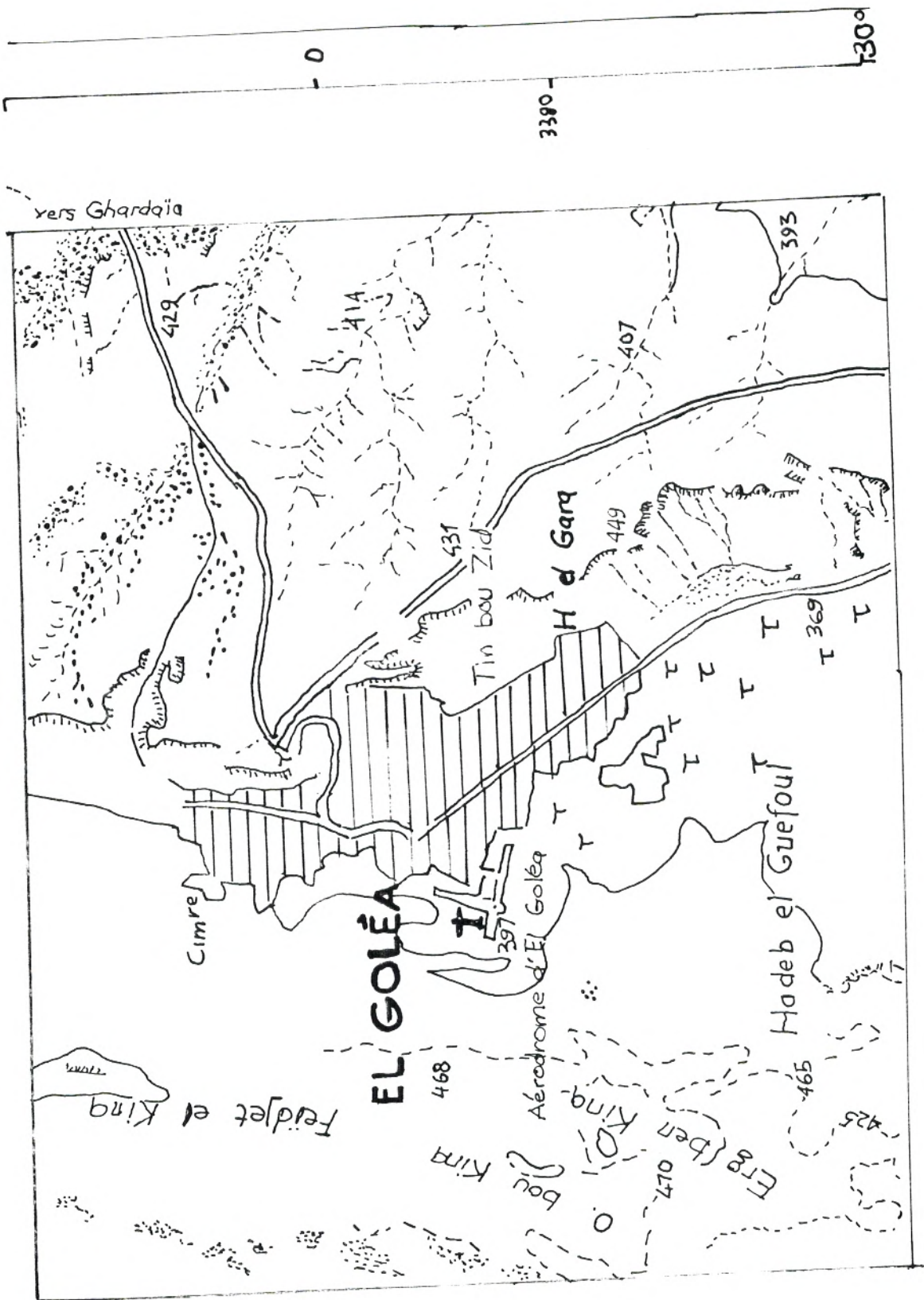


Figure no 4 Situation du lac d'El-Goléa  
(extrait de la carte topographique, feuille d'El-Goléa au 1/200000<sup>ème</sup> échelle agr.  
au 1/50000)

Ce travail se fait en parallèle à d'autres qui étudient d'autres types de microorganismes: les champignons (BOUTAIBA, 1997); les archéobactéries (BOUDJELLAL, 1997); les algues (BOUBETRA, 1997).

Nous avons procédé à des prélèvements d'échantillons d'eau des quatre stations ainsi que des boues. Ces prélèvements ont été réalisés sur le bord du lac et dans les marées périphériques. Cinq échantillons ont été prélevés de chacune des quatre stations du lac. Nous avons rempli stérilement aux 3/4 cinq bouteilles de 1000ml et des flacons de 250ml stériles. Ces prélèvements ont été effectués deux fois au courant du mois d'Octobre de l'année 1994 et le mois de Mars de l'année 1995. Notons qu'au moment des prélèvements, nous avons relevé la température et le pH ainsi que les caractères organoleptiques de l'eau car certains caractères tels que: l'odeur et la couleur disparaissent pendant le transport (RODIER, 1976).

## 1.2 Données physico-chimiques

Dans le souci de mieux connaître cette flore particulière, il nous a paru nécessaire d'étudier quelques caractéristiques physico-chimiques du lieu des prélèvements: le lac d'El Goléa. Ces différentes analyses ont été effectuées au sein d'une entreprise publique: EPEAL d'ALGER (Tableaux n° 10 et n° 11).

Tableau n°10 : Résultats des analyses physico-chimiques du 1<sup>er</sup>  
prélèvement (Octobre 1994)

	Station I	Station II	Station III	Station IV
	<b>Paramètres Physicochimiques</b>			
Températures	20	21	20	22
pH	8,88	8,39	8,57	8,24
Conductivité ms/cm	1651,4	3484,5	5255,5	6704,4
Turbidité NTU	0,49	25	16,2	16,2
Résidus secs mg/l	940	1698	ND	6184,2
	<b>Paramètres de pollution</b>			
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg/l	traces	traces	traces	traces
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/l	0,16	< 0,02	< 0,02	< 0,02
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> mg/l	3,13.10 <sup>-3</sup>	< 0,002.10 <sup>-3</sup>	< 0,002	< 2.10 <sup>-6</sup>
Mat.Oxyd mg O <sub>2</sub> /l	0,96	7,04	7,84	ND
	<b>Minéralisation globale</b>			
Ca <sup>2+</sup> mg/l	105,04	76,7	91,1	60,3
Mg <sup>2+</sup> mg/l	38,4	57,12	44,4	269,5
Na <sup>+</sup> mg/l	219,5	410,5	415	19750
K <sup>+</sup> mg/l	45,5	72,5	77,4	2240
Cl <sup>-</sup> mg/l	287,5	548,5	580,7	31645,35
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg/l	207,4	190,6	243,7	170,9
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l	235,46	163,4	139,08	136,64
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l	28,20	24,36	ND	ND
Dureté df	168	171,2	164,2	1047,2
TAC df	77,2	53,6	76	44,8

ND: Non déterminé.

Tableau n° 11 : Résultats des analyses physico-chimiques du 2<sup>ème</sup>  
prélèvement (Mars 1995)

	Station I	Station II	Station III	Station IV
	<b>Paramètres Physicochimiques</b>			
Températures	15	15 à 16	15	15
pH	8,11	8,5	8,29	8,22
Conductivité ms/cm	1192	1127	2490	41500
Turbidité NTU	6,5	16,4	4,5	5,4
Résidus secs mg/l	ND	682	1858	ND
	<b>Paramètres de pollution</b>			
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg/l	0,121	0,079	0,16	0,072
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/l	0,03	0,13	0,14	< 0,02
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> mg/l	< 0,05	traces	< 0,05	< 0,05
Mat.Oxyd mg O <sub>2</sub> /l	4,37	2,94	5,19	3,64
	<b>Minéralisation globale</b>			
Ca <sup>2+</sup> mg/l	55,15	47,73	85,23	2398
Mg <sup>2+</sup> mg/l	28,77	29,03	46,95	14,78
Na <sup>+</sup> mg/l	159,25	157,25	275,5	8590
K <sup>+</sup> mg/l	91,75	27,25	53	65
Cl <sup>-</sup> mg/l	185,92	172,95	350,83	14491,24
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg/l	210,84	101	102	405
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l	364,17	109,8	129,32	88,45
Dureté totale (TH)	94,6	88,2	71,8	44,6
T.A.C	39,4	36	42,4	29

ND: Non déterminé.

## 2 - MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Prélèvement des échantillons

Quatre stations sont étudiées, cinq échantillons de chacune des stations sont prélevés. Une description sommaire de chacune des stations est représentée dans le tableau n° 12.

Tableau n° 12: Description des stations du lac d'El Goléa

Station I	Station II	Station III	Station IV
- Début du lac, proche de la ville (peu de sel)	- Grand lac profond de 800m à 1km de diamètre, éloigné de la station I de 8,5km	- Canal de 4m de diamètre et 1,5m de profondeur, situé après le barrage	- Grand lac de 3km de diamètre
- Egoûts, riches en matière organique	- Existence de nombreuses plantes	- Eau verdâtre	- Peu profond $\approx$ 20cm, la plus salée des stations
- Arbustes, plantes, animaux	- Existence de Tomarix et arbustes	- Présence de moustiques sur les bords	- De couleur limpide et sans odeur
- Mare stagnante, vase noirâtre	- Couleur: bleu ciel	- Existence de plantes halophiles	
- Profondeur 10 à 50cm	- Présence d'insectes		
- Couleur trouble, avec des suspensions verdâtres			



## 2.2 Isolement et sélection des souches d'Actinomycètes ou genres apparentés

### 2.2.1 Milieu d'isolement et agents sélectifs

Nous avons choisi le milieu ISP<sub>2</sub> comme milieu d'isolement, milieu préconisé par SHIRLING et GOTTLIEB (1968).

Nous avons additionné le milieu ISP<sub>2</sub> d'antibiotiques antibactérien et antifongique afin d'éviter les contaminations par les bactéries et les champignons.

Ces antibiotiques sont le cycloheximide (50mg/l) et la gentamycine (20mg/l).

Notre étude cible la détection d'Actinomycètes ou bactéries apparentées halophiles.

Pour cela, nous avons effectué les isolements à différentes concentrations de NaCl: 3%, 10%, 20% et 25%.

Le milieu ISP<sub>2</sub> a été donc additionné de quantité de NaCl correspondant aux pourcentages cités précédemment, avec un pH = 7 - 7,2.

### 2.2.2 Ensemencements et incubation

#### - Les échantillons de sol (Boues)

Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspensions-dilutions.

Les suspensions mères sont préparées par agitation vigoureuse (pendant 10mn à l'aide d'un vortex) de 5g de sol sec dans 50ml d'eau distillée. Elles sont ensuite diluées de 10 en 10 ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ).

0,1ml des deux dernières dilutions ( $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ) est étalé sur le milieu ISP<sub>2</sub> précédemment coulé dans les boîtes de Pétri stériles. Cinq répétitions sont effectuées pour chacune des dilutions.

Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C et 45°C pendant 14 à 21 jours puis examinées au microscope.

#### - Les échantillons d'eau du lac

Les ensemencements sont effectués en profondeur. 1ml de l'échantillon de chaque site est déposé au fond des boîtes de Pétri stériles puis recouvert du milieu de culture ISP<sub>2</sub> additionné des différentes concentrations de NaCl.

Cinq répétitions sont effectuées pour chacune des concentrations de NaCl.

Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C et 45°C pendant 14 à 21 jours puis examinées au microscope.

#### **2.2.3 Purification et conservation des souches**

Les souches pures, numérotées, sont repiquées sur le même milieu (ISP<sub>2</sub>) coulé en pente dans des tubes à vis pour les souches mésophiles et dans des tubes en verre spécifiques (25×100) pour les souches thermophiles puis conservées à 4°C dans une chambre froide.

Exemple: la souche numérotée A125M est une souche qui provient de la station I (1) à 25% de NaCl (25), mésophile (M) et (A) est un code personnel.

### **2.3 Identification des souches isolées**

L'étude des caractères chimiques et morphologiques permet de déterminer les genres les plus courants.

#### **2.3.1 Caractéristiques culturelles et micromorphologiques**

Ces caractéristiques sont déterminées sur les milieux spécifiques ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>3</sub> et ISP<sub>4</sub> recommandés par SHIRLING et GOTTLIEB (1966) pour l'étude de la morphologie des Actinomycètes. Après 7, 14 et 21 jours d'incubation, à 28°C pour les souches mésophiles et 45°C pour les souches thermophiles, nous notons l'évolution de la croissance

et du développement du mycelium aérien et du substrat et celle des pigments diffusibles sur chaque milieu.

L'observation de la morphologie des chaînes de spores est effectuée en utilisant un microscope Zeiss (grossissements 100 et 400).

### **2.3.2 Analyse des hydrolysats et des extraits cellulaires**

Cette analyse est nécessaire pour confirmer la détermination du genre.

Elle est effectuée à partir d'hydrolysats ou d'extraits cellulaires par chromatographie descendante sur papier (Watman n°1).

Il s'agit dans ce cas de déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique et de noter la présence ou non de la glycine ainsi que des sucres.

#### - Mise en culture des Actinomycètes

Les isolats d'Actinomycètes sont cultivés en milieu agité (ISP<sub>2</sub> liquide) à une température de 28°C (mésophiles) et 45°C (thermophiles) pendant 7 à 8 jours. Le mycelium est recueilli par centrifugation, lavé plusieurs fois en eau distillée et une dernière fois à l'alcool éthylique puis séché.

#### - Mise en évidence de l'acide diamino-pimélique (D.A.P) et de la glycine (BECKER et al, 1964)

Après hydrolyse drastique du mycelium à l'acide chlorhydrique 6N, les hydrolysats sont obtenus par filtration (filtre en verre), puis le liquide est évaporé à 40°C. Le résidu est dissout dans 1ml d'eau distillée, puis soumis à une nouvelle évaporation. Ce processus est répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 3,5 et 6.

Le résidu final est récupéré une dernière fois dans 0,3ml d'eau distillée puis analysé par chromatographie descendante sur papier n°1.

Le solvant est un mélange de méthanol, eau distillée, acide chlorhydrique 10N et pyridine (80:17,5:2,5:10V/V).

Les chromatogrammes sont révélés avec une solution de 0,2% de ninhydrine dissoute dans l'acétone. La forme LL de D.A.P migre plus vite que la forme méso. La glycine de couleur violette migre plus vite que le D.A.P.

### **2.3.3 Mise en évidence des sucres**

Le mycelium est hydrolysé à l'acide sulfurique 1N.

Le pH est ajusté à 5 - 5,5 en ajoutant une solution saturée d'hydroxyde de baryum. Le précipité obtenu est éliminé par centrifugation.

Le surnageant est évaporé à 40°C et le résidu final est dissout dans 0,3ml d'eau distillée. Les sucres sont détectés par chromatographie descendante dans un solvant composé de:

n-butanol, eau distillée, pyridine, toluène

(5:3:3:4 V/V)

### **2.3.4 Les souches apparentées**

Ces dernières sont apparentées aux Actinomycètes par leur caractère filamenteux; elles sont donc retenues. Nous étudions leurs caractéristiques culturelles et micromorphologiques qui constituent, dans un premier temps, le seul critère d'identification.

## 2.4 Etude de l'optimum de salinité

Nous avons étudié l'optimum de salinité des souches isolées à 10% de NaCl et plus, sur milieu solide (ISP<sub>2</sub>) en faisant varier les concentrations de NaCl: 3%, 7%, 10%, 15%, 20% et 25% et comparer à un témoin sans sel.

La tolérance à la salinité des isolats est caractérisée en se référant à la classification proposée par KUSHNER (1978) et LARSEN (1986) (Tableaux n°13 et n°14).

Tableau n°13: Classification des organismes en fonction de  
leur tolérance à la salinité  
(KUSHNER, 1978)

Catégorie	Réaction vis à vis de la [NaCl]
Non halophiles	Poussent bien à une [NaCl] < 0,21M
Faibles halophiles	Poussent bien à 0,2M de NaCl
Halophiles modérés	poussent bien entre 0,5 et 2,5M
Halophiles extrêmes limites	poussent bien entre 1,5 et 4M
Halophiles extrêmes	poussent bien entre 2,5 et 5,2M

Tableau n°14: Classification des microorganismes halotolérants  
(LARSEN, 1986)

Catégorie	Réaction vis à vis de la [NaCl]
Halotolérants faibles	Peuvent pousser à 1,25M de NaCl
Halotolérants modérés	Peuvent pousser à [NaCl] ≤ 1,25M
Halotolérants extrêmes	Peuvent pousser à [NaCl] ≤ 2,5M

## 2.5 Tests d'antibiose

### 2.5.1 Microorganismes-cible

Les germes-cible utilisés lors du premier stade de criblage ont été:

\* Les bactéries: *Bacillus subtilis*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

\* Les levures: *Candida albicans*, *Rhodotorulla mucilaginosa*.

La souche *Candida albicans* a été retenue car elle est très pathogène.

\* Les champignons filamenteux: *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* et *Pythium irregulare*.

La souche de *Pythium* est dépourvue de stérols membranaires cibles des macrolides polyènes.

Les souches actives sont retenues pour être retestées vis à vis d'autres germes (*Streptococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella*) après ce premier criblage ont été ensuite testées vis à vis d'autres germes.

La liste des germes-cible ainsi que leurs origines figurent dans le tableau n° 15.

Tableau n° 15 : Microorganismes-cible utilisés

		Genres et espèces	Origine
BACTERIES	GRAM <sup>+</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	IPA
		<i>Streptococcus aureus</i>	IPA
	GRAM <sup>-</sup>	<i>Escherichia coli</i>	IPA
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPA
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IPA
		<i>Shigella</i>	IPA
Champignons levuriformes		<i>Candida albicans</i>	IPA
		<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	INPL
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	isolée de la levure de Boulanger
Champignons filamenteux		<i>Pythium irregulare</i>	U.DIJON
		<i>Aspergillus niger</i>	Inst.Bio Tlemcen
		<i>Fusarium oxysporum</i>	URZA
		<i>f.sp albedinis</i>	

IPA : Institut Pasteur d'ALGER

INPL : Institut National Polytechnique de LORRAINE

U.DIJON: Université de DIJON

URZA : Unité de recherches sur les zones arides



### 2.5.2 Méthode des disques d'agar

#### - Antagonisme Actinomycètes-Bactéries

Un inoculum prélevé à partir d'une culture bactérienne pure de 24 heures est mis en suspension dans 10ml d'eau distillée stérile.

Après homogénéisation, 2 à 3 gouttes de la suspension sont mises au centre des boîtes contenant de la gélose Mueller Hinton, puis étalées uniformément en utilisant un étaloir en verre stérile.

Trois disques d'agar de 6mm de diamètre d'une culture d'Actinomycète âgée d'une semaine environ, sont déposés à la surface du milieuensemencé au préalable et mis une nuit à 4°C de manière à arrêter momentanément la croissance des bactéries et permettre la diffusion des antibiotiques puis incubés à 37°C.

Les lectures sont effectuées après 24h d'incubation.

Elles consistent à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition.

#### - Antagonisme Actinomycètes-champignons et levures

Les levures sont testées de la même manière que les bactéries.

Pour les champignons, la méthode est la même que la précédente, seulement, pour chaque isolat, quatre disques d'Actinomycètes sont déposés à 2cm autour d'une colonie de champignons âgée de 2 à 4 jours. Les lectures se font après 7 jours. Elles consistent à mesurer le diamètre d'inhibition et apprécier visuellement l'intensité de l'action antifongique.

## 2.6 Test de l'activité des souches cultivées en milieu liquide

40ml du milieu ISP<sub>2</sub> liquide sont introduits dans des Erlenmeyers de 250ml. Après stérilisation, le milieu est inoculé avec les souches préalablement actives sur milieu solide. Les fioles sont agitées à

l'aide d'un agitateur pendant deux semaines à température de l'incubation de la ou des souches choisies.

Après incubation, le contenu de chaque fiole est centrifugé à 200 tours/mn pendant 15mn.

Le surnageant est récupéré.

Des disques de papier stériles sont imprégnés par 200 $\mu$ l de ce surnageant puis déposés sur le milieu Mueller Hinton ou Sabouraud semi-liquide, fraîchement ensemencé par le microorganisme-test.

L'incubation est réalisée à la température du germe test pendant 24 heures. La lecture est effectuée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition.

### **3 - RESULTATS ET DISCUSSION**

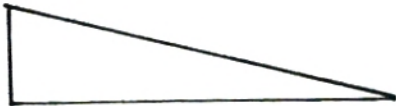


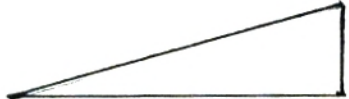
#### **3.1 Analyses physico-chimiques des échantillons d'eau**

Les résultats sont donnés dans les tableaux n° 11 et n° 12. Il en ressort:

- ces eaux sont alcalines (le pH variant entre 8 et 9) et salées;
- l'existence d'un gradient de salinité qui va en augmentant de la station I à la station IV et d'un gradient de pollution qui va dans le sens inverse de celui de la salinité. Ces deux gradients exercent une forte pression de sélection sur la microflore du lac d'El Goléa.

Le tableau n° 16 met en relief et résume les résultats de l'analyse physico-chimique.

Tableau n°16 : Résultats physico-chimiques

Stations Paramètres	Prélèvement Octobre				Prélèvement Mars			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
pH	8,38	8,39	8,57	8,50	8,11	8,50	8,29	8,22
Minéralisation globale à 25°C (g/l)	1,25	2,64	3,02	3,98	ND	0,90	0,85	35,29
Sens du gradient de Salinité								
NH <sub>4</sub> (mg/l)	traces	traces	traces	traces	ND	0,12	0,08	0,07
NO <sub>2</sub> (mg/l)	0,16	< 0,02	< 0,02	< 0,02	ND	0,13	0,03	0,03
PO <sub>4</sub> (mg/l)	0,01	< 0,002	< 0,002	< 0,002	ND	20,05	20,05	traces
Sens du gradient de pollution								

ND: Non déterminé

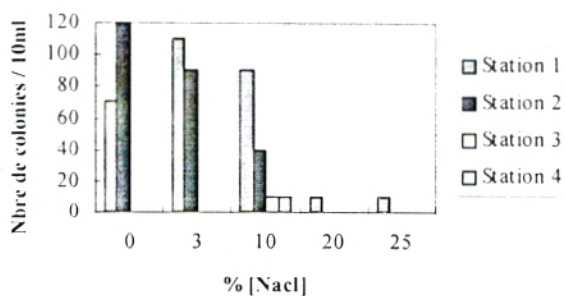
### 3.2 Isolement et dénombrement

Tous les résultats obtenus ont été regroupés et représentés sous forme d'histogramme (figure n°5).

Le dénombrement de la flore des Actinomycètes et genres apparentés dans les eaux du lac d'El Goléa montre que cette dernière est présente à un pourcentage relativement faible.

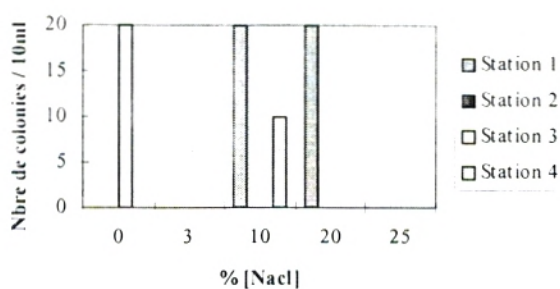
Les connaissances sont limitées quant à l'étude des Actinomycètes dans le milieu marin et notamment, comme dans le cas présent, un lac salé.

LES MESOPHILES



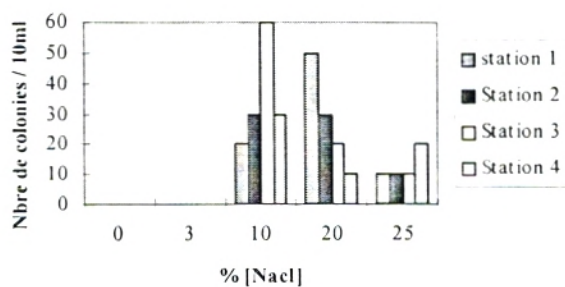
- 5a -

LES THERMOPHILES



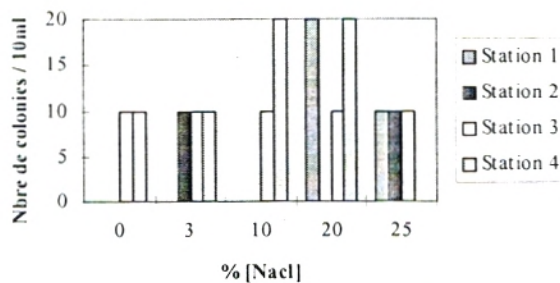
- 5a -

LES MESOPHILES



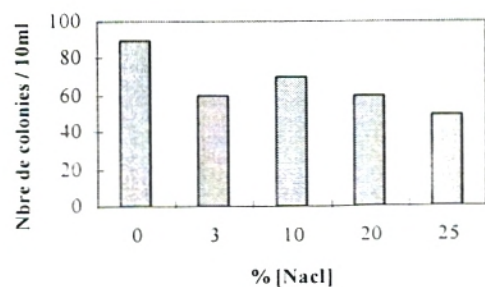
- 5b -

LES THERMOPHILES



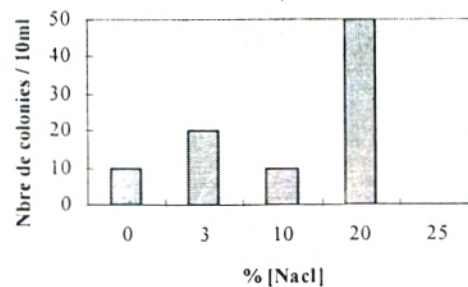
- 5b -

LES MESOPHILES



- 5c -

LES THERMOPHILES



- 5c -

Figure n° 5

Bilan total des dénombrements

5a : dénombrement du prélèvement Octobre

5b : dénombrement du prélèvement Mars

5c : dénombrement du prélèvement des boues

En 1970, KAYAMURA et TAKADA ont découvert une espèce halophile: *Streptomyces halophila*.

Ceci a suggéré l'existence d'Actinomycètes dans des environnements riches en sel. Plus tard, en 1975, une autre espèce halophile a été découverte accidentellement (dans un milieu contaminé) par l'équipe de GOCHNAUER: *Actinopolyspora halophila*.

Il y a très peu de littérature concernant les Actinomycètes vivant dans un environnement aquatique et de surcroît salé; néanmoins, des investigations ont été réalisées sur la colonisation du milieu marin par les Actinomycètes et il en est ressorti une controverse:

Selon WEYLAND (1981), il existerait une flore d'Actinomycètes spécifiques aux sédiments marins alors que McCARTHY et WILLIAMS (1990) ont remarqué que la diversité taxonomique rencontrée est comparable à celle du sol et donc les isolats sont simplement le résultat d'un "Wash in", c'est à dire les Actinomycètes aquatiques sont dans leur grande majorité telluriques.

Les résultats de nos dénombrements constitueront un complément de données sur les Actinomycètes vivant dans un milieu riche en sel.

Ils montrent que les thermophiles sont présents à un pourcentage très faible par rapport aux mésophiles.

Nous notons également que le prélèvement du mois de Mars est plus riche en thermophiles que celui d'Octobre. Cette flore, du fait de sa température de croissance, évolue pendant la saison où la température s'élève.

Les stations III et IV sont les stations les plus pauvres en germes, ceci est probablement dû à la forte salinité qui limite le nombre d'Actinomycètes ou genres apparentés. Nous ne pouvons réellement estimer l'évolution de cette flore du fait du nombre réduit des

prélèvements d'une part, et d'autre part, les résultats obtenus ne sont pas très significatifs ou du moins soulignent une présence très pauvre de cette flore. Cette flore Actinomycétale est moins importante que les champignons (BOUTAIBA, 1997), alors que dans les sols, ce sont les actinomycètes qui prédominent (DOMMARGUES et MANGENOT, 1970).

### 3.3 Identification

Au total, 135 souches ont été isolées. Celles-ci ont été retenues sur la base des critères suivants, dont les principaux sont morphologiques:

- La présence, l'abondance, l'importance et la disposition des hyphes du mycellium du substrat ou du mycellium aérien.
- La présence de spores, de sporanges ou de sclérotés.
- Couleur et croissance particulière.
- Colonies punctiformes.

Parmi les 135 souches isolées:

- 94 appartiennent au groupe des Actinomycètes.
- Les 41 autres souches sont des bactéries filamenteuses autres que les Actinomycètes.

Après une étude morphologique et chimique des parois, les souches d'Actinomycètes ont été classées de la manière suivante:

- 40 souches sont rattachées au genre *Streptomyces*,
- 35 au genre *Micromonospora*,
- 19 au genre *Thermoactinomyces*

Les caractères morphologiques et physiologiques sont regroupés dans les tableaux n° 17 et n° 18.

Tableau n° 17 : Caractéristiques morphologiques des isolats d'Actinomycètes

Groupes morphologiques et isolats n°	Croissance sur milieu	Couleur du mycelium aérien (MA)	Couleur du mycelium de substrat	Pigments solubles
	ISP <sub>2</sub> , ISP <sub>3</sub> et ISP <sub>4</sub>			
G <sub>1</sub> : n°1 à n°15	Bonne	Blanc	Beige	-
G <sub>2</sub> : n°16 à n°40	Bonne	Gris	Gris-foncé	-
G <sub>3</sub> : n°41 à n°60	Bonne	-	Orange vif et brun olive	Traces jaunâtres et olive brun
G <sub>4</sub> : n°61 à n°75	Bonne	-	Brun rouge	Brun moyen à violet
G <sub>5</sub> : n°76 à n°94	Bonne	Jaune-marron	Marron	-

- : Absence



Tableau n° 18 : Analyse chimique

Groupe d'isolats	Type pariétal	D.A.P	Glycine	Arabinose	Galactose
G <sub>1</sub> , G <sub>7</sub>	I	LL-DAP	+	-	-
G <sub>3</sub> , G <sub>4</sub>	II	MESO-DAP	+	+	-
G <sub>5</sub>	III	MESO-DAP	-	-	-

Le genre *Streptomyces* est prédominant; il représente environ 40% de la flore Actinomycétale. Par contre, dans le sol, ce pourcentage serait de 80% environ. En effet, des travaux effectués par DOMMERGUES et MANGENOT, 1970, et AMIR et *al*, 1989, montrent la présence majoritaire du genre *Streptomyces* dans le sol. Il y a donc réduction de moitié du nombre de *Streptomyces* dans les eaux du lac d'El Goléa étudié. McCARTHY et WILLIAMS (1990) soulignent la présence de *Streptomyces* dans les eaux lacustres ou marines. Il est suivi de très près par les *Micromonospora* (environ 31%) et à un degré moindre les *Thermoactinomyces* (environ 20%).

Les genres *Micromonospora* et *Thermoactinomyces* figurent parmi les principaux genres rencontrés dans les eaux douces et occasionnellement marines. Il y a lieu de noter l'absence des autres genres habituellement retrouvés dans les écosystèmes aquatiques comme les Nocardioformes et les bactéries Corynéformes ainsi que la présence du genre *Microbispora* (WEYLAND, 1981). D'autres genres d'Actinomycètes aquatiques sont cités: *Actinoplanes*, *Nocardia* et *Rhodococcus*.

La tendance actuelle est de penser que tous les Actinomycètes aquatiques seraient en fait issus du sol ou de supports organiques (fumiers, composts).

Les eaux de ruissellement entraîneraient ces souches bactériennes vers les rivières, les fleuves et les lacs où on les retrouve principalement sous leur forme de résistance, c'est à dire la spore (CROSS, 1981).

Des études effectuées sur l'eau ont montré que la concentration en nutriments est insuffisante pour permettre le développement des streptomycètes (WOOD et *al*, 1985).

Notre étude nous a permis de retrouver uniquement trois genres qui sont d'ailleurs rapportés précédemment.

L'absence des autres genres reconnus aquatiques montre que le milieu d'étude est assez particulier.

Les 4 souches restantes non identifiées sont des genres apparentés aux Actinomycètes par leur caractère filamenteux; ils sont prédominants par rapport aux Streptomycètes. Ces derniers sont tous des isolats retrouvés à 20% et 25% de sel et présentent tous la même morphologie et se répartissent en deux groupes en se basant sur la couleur: rouge marron ou noir brunâtre. Ce sont des microcolonies repérables uniquement sous microscope, poussant en tête d'épingle dans la gélose sur milieu ISP<sub>2</sub>, et ne présentant pas de mycellium aérien.

Elles sont microaérophiles et leur croissance en tête d'épingle est peut-être due au stress provoqué par la concentration en sel. Ces deux hypothèses que nous essaierons de confirmer par la suite. Ces souches très particulières ont été retenues; elles présentent trois caractéristiques: la microaérophilie, bourgeonnement donnant des fructifications apparentées à des filaments et une couleur soit brunâtre ou marron orange. Ces isolats se rapprochent d'un groupe de bactéries particulier, connu sous le nom de bactéries métalliques ou "Iron Bactéria" (PRINGSHEIM, 1948).

### 3.4 Optimum de salinité

Les Actinomycètes isolés, au nombre de 94, ont un optimum de salinité: 7% de NaCl, soit 1,19M, tandis que les bactéries métalliques ont un optimum de 25%, soit 4,2M. Si l'on se réfère à la classification de KUSHNER et LARSEN, les premières sont des halophiles

modérés et halotolérants modérés et les secondes des halophiles extrêmes et halotolérants faibles.

### 3.5 Résultats des tests d'antibiose

Nous avons étudié l'activité des 135 souches contre les germes-cible suivants:

*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Rhodotorulla mucilaginosa*. Les résultats figurent dans le tableau n° 19. Les résultats ont montré que seules 30 souches présentent une activité contre au moins un germe-cible ( tableau n° 19); les autres souches sont soit inactives, soit présentent une activité négligeable.

Nous avons retenu les deux souches de bactéries métalliques mésophiles: la A125M et la C25SM.

La première présentant une activité antifongique et, en particulier, contre *Candida albicans* et la deuxième une activité antibactérienne, contre les Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>.

La A125M a été isolée dans la station I à 25% de sel tandis que la C25SM provient des boues et retrouvée aussi à 25% de sel.

Nous avons choisi ces deux souches car elles appartiennent au groupe d'isolats particuliers et poussent à 25% de sel et, bien sûr, pour leurs activités antibiotiques très intéressantes (voir planche 1).

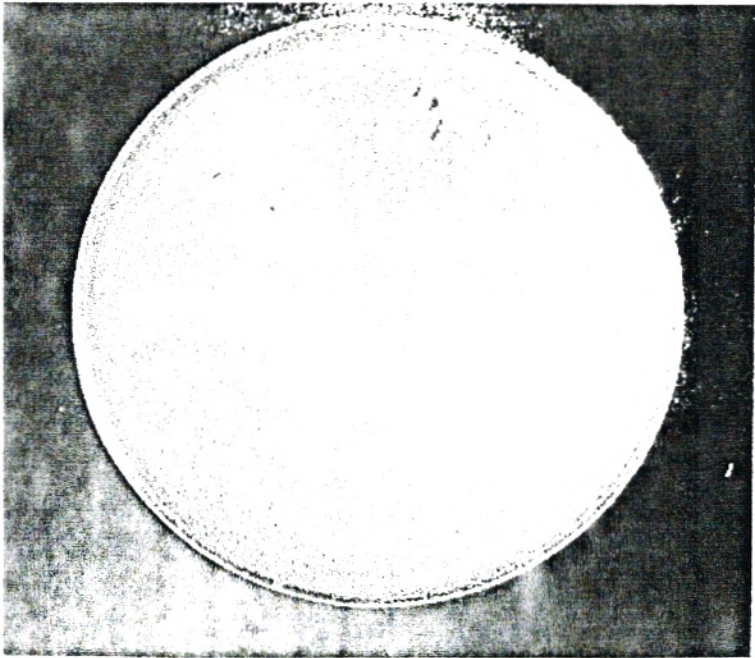
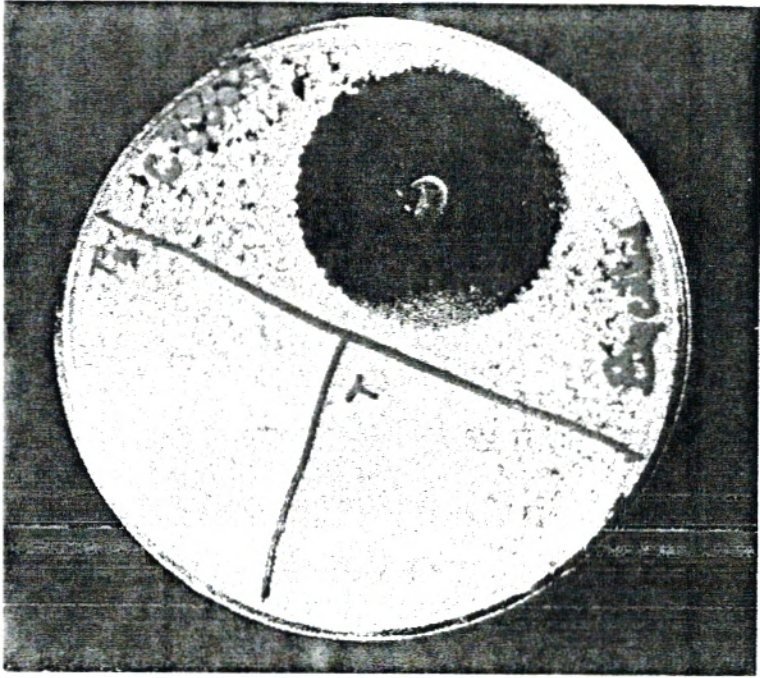


Planche 1

Ceci se réfère aux stratégies actuelles de screening (voir Chapitre I) qui s'orientent vers le choix de germes extrêmes dans des milieux tous aussi extrêmes.

L'identification sera approfondie une fois l'activité antibiotique en milieu liquide réalisée. En l'occurrence, avant d'entreprendre l'étude des produits que les deux souches sélectionnées synthétisent.

Tableau n° 19 : Activité antibiotique des principaux isolats  
sur milieu solide

Souches	GERMES CIBLE				
	1	2	3	4	5
A53M; <i>Streptomyces</i>	-	10	-	13	10
A'53M; <i>Streptomyces</i>	-	15	-	15	12
AOSM; <i>Streptomyces</i>	-	7	8	-	-
A3SM; <i>Streptomyces</i>	-	8	-	25	11
A23M; <i>Streptomyces</i>	7	11	9	-	-
A10M; <i>Streptomyces</i>	-	10	-	-	-
A20M; <i>Streptomyces</i>	25	8	-	-	-
B20M; <i>Streptomyces</i>	-	15	-	-	-
A23M; <i>Streptomyces</i>	7	11	9	-	-
A110M; <i>Micromonospora</i>	7	40	8	-	-
B110M; <i>Micromonospora</i>	9	37	7	-	-
C110M; <i>Micromonospora</i>	7	40	-	-	-
A210M; <i>Micromonospora</i>	-	10	9	10	7
D110M; <i>Micromonospora</i>	-	35	-	-	-
A110Ma; <i>Micromonospora</i>	-	10	22	-	-
A325M; <i>Micromonospora</i>	-	-	12	-	-
B25SM; Bact métall	-	20	8	-	-
C25SM; Bact métall	37	36	17	-	-
D25SM; Bact métall	11	20	9	-	-
A125M; Bact métall	-	-	-	28	-
A220Ma; Bact métall	-	8	-	-	-
A30T; <i>Thermoactinomyces</i>	7	10	7	9	8
B30T; <i>Thermoactinomyces</i>	7	9	11	-	-
A520T; <i>Thermoactinomyces</i>	-	10	-	-	-
A120T; <i>Thermoactinomyces</i>	11	9	9	9	-
B120T; <i>Thermoactinomyces</i>	7	10	11	7	-
A510T; <i>Thermoactinomyces</i>	-	15	11	-	-
A120TMa; <i>Thermoactinomyces</i>	-	12	-	-	-
A325TMa; <i>Thermoactinomyces</i>	-	9	-	-	-
A225TMa; <i>Thermoactinomyces</i>	9	18	10	7	-
A320TMa; <i>Thermoactinomyces</i>	13	14	9	7	-

1: *Bacillus subtilis* , 2: *Escherichia coli* , 3: *Pseudomonas aeruginosa*  
4: *Candida albicans* , 5: *Rhodotorulla mucilaginosa*

\* Les zones d'inhibition sont exprimées en mm.

\* Les chiffres indiquent le diamètre de la zone d'inhibition, y compris celui du disque.

\* (-) : La zone d'inhibition est nulle, donc égale au diamètre du disque (6mm).

### 3.6 Culture en milieu liquide des souches A125M et C25SM

Après 14 jours d'incubation, les cultures des deux souches A125M et C25SM sont récupérées.

Il n'y a pas formation de pellicules pour les deux souches, comme c'est le cas pour la quasi-totalité des Actinomycètes.

\* La souche A125M: le milieu n'est pas trouble comme chez les autres bactéries contenant des corpuscules noirs.

\* La souche C25SM: le milieu n'est pas trouble, contenant des sortes de pellicules membranaires de couleur marron.

Après centrifugation, nous avons testé l'activité des surnageants de chacune des deux souches.

Nous avons utilisé deux germes-cible: *Candida albicans* (A125M) et *Bacillus subtilis* (C25SM). Les zones d'inhibition, exprimées en mm, retrouvées pour chacune des deux souches A125M et C25SM sont respectivement 12mm et 15mm. L'activité antibiotique de ces deux souches a été donc retrouvée en milieu liquide; cependant, nous remarquons que les zones d'inhibition obtenues sont inférieures à celles obtenues sur milieu solide.

En fait, le passage des milieux solides aux milieux liquides pose quelquefois problème quant à l'efficacité de la production d'antibiotique en milieu liquide.

SHOMURA et *al* (1979) et NISBET (1982) expliquent cela par le fait que la répartition des nutriments dans les milieux liquides varie avec le temps de fermentation alors que leur distribution en milieu solide et autour de colonies ne varie pas ou très légèrement.

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être expliqués par le fait que les surnageants n'ont pas été concentrés et, par conséquent, l'activité antibiotique est diluée et donc plus faible.



#### 4 - IDENTIFICATION DES SOUCHES A125M ET C25SM

##### 4.1 Rappels sur les caractéristiques des souches A125M et C25SM

\* La souche A125M a été isolée dans la station I du lac d'El Goléa à 25% de sel; elle présente une activité antifongique spécifique anti *Candida albicans* et non sur les autres bactéries et autres levures. Elle pousse à 30°C (mésophile) avec un temps d'incubation, sur milieu solide, très long, environ 25 jours et se caractérise par un type de croissance très particulier, en tête d'épingle, sous forme de microcolonie de couleur brune.

Dans un premier temps, nous avons pensé que ce type de croissance était dû au stress provoqué par la haute concentration en sel; or, après avoir étudié les optimums de salinité, il s'est avéré qu'elle croît de la même manière dans un milieu témoin (0% de sel). L'observation sous microscope directement sur boîte a montré l'existence de filaments qui irradient du centre, donnant à la microcolonie l'apparence d'une "araignée" (voir schéma).

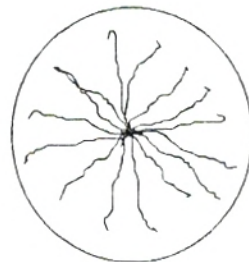


Schéma représentant une colonie de la souche A125M cultivée sur milieu ISP2, observée sous microscope directement sur boîte

\* La souche C25SM a été retrouvée dans les boues du lac d'El Goléa à 25% de sel; elle présente une activité antibactérienne anti Gram<sup>+</sup> et anti Gram<sup>-</sup>. Elle pousse à 30°C (mésophile) avec un temps d'incubation assez long de l'ordre de 21 jours, donc une croissance très lente.

Sa croissance sur milieu solide est identique à la précédente, pousse pratiquement sous la gélose. Pour les deux souches, l'absence de mycelium aérien est notée.

Sa couleur est orange, tirant vers le marron.

L'observation sous microscope directement sur boîte nous a permis de visualiser des filaments fins dont la disposition est aléatoire.

L'analyse des parois de ces deux souches a été impossible à réaliser car ces deux souches ne produisent pas suffisamment de biomasse en milieu liquide; c'est l'une des principales raisons qui nous a incité à effectuer la microscopie électronique à balayage afin donc d'avoir une idée précise de la morphologie de ces deux souches et constituera un début de piste pour l'identification de ces deux isolats et, par la suite, les 92 autres isolats.

## 4.2 Microscopie électronique à balayage

Nous avons préparé les cultures des souches A125M et C25SM poussant sur ISP<sub>2</sub> liquide et âgées chacune de 14 jours.

La fixation des deux échantillons a été réalisée avec l'aide du Professeur Luc MARCHAL à la Faculté de Médecine, Service de microscopie électronique, NANCY (figure n°6).

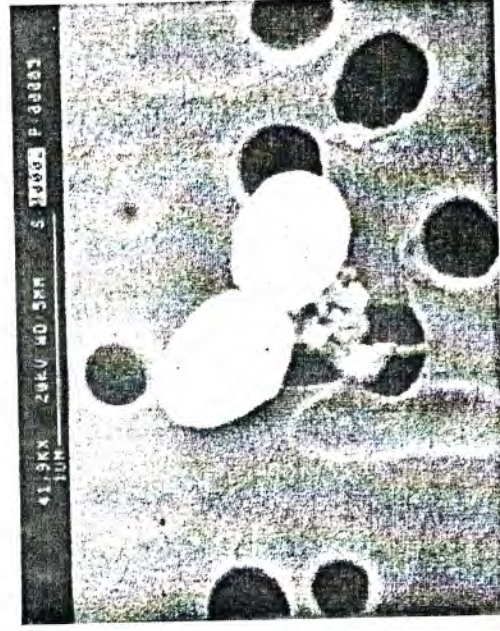
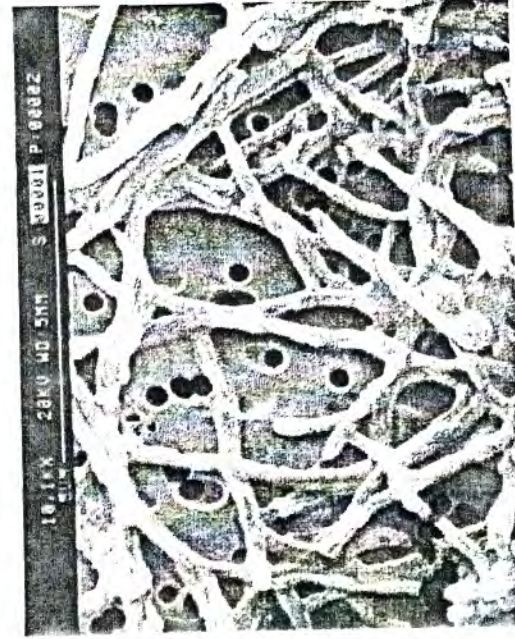
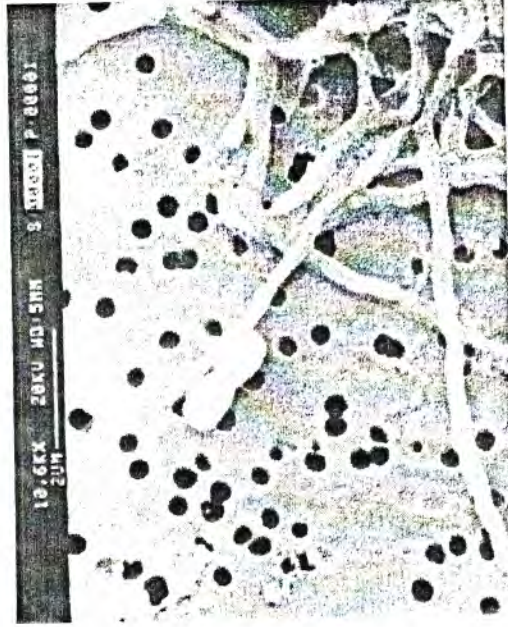
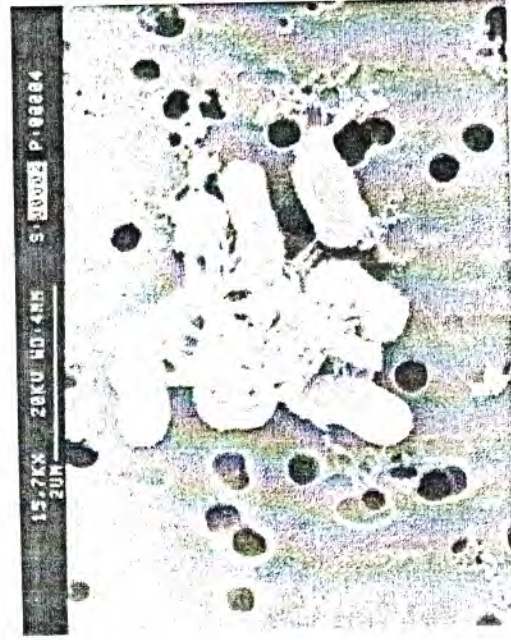
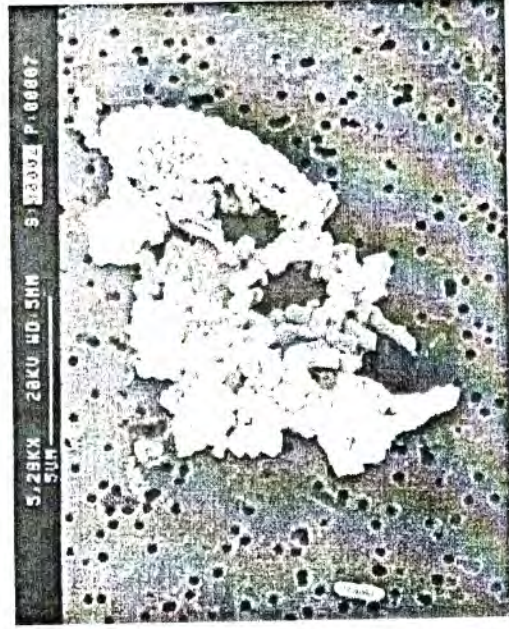
- La souche A125M (figure 6a n°1) est effectivement filamenteuse; nous remarquons des filaments qui irradiant du centre, donnant à la colonie une forme d'"araignée"; la figure 2 montre bien l'existence des

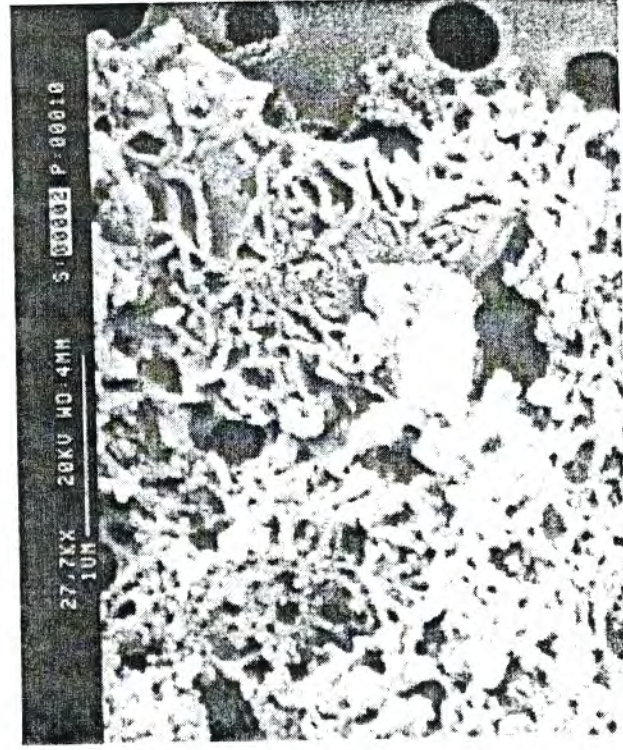
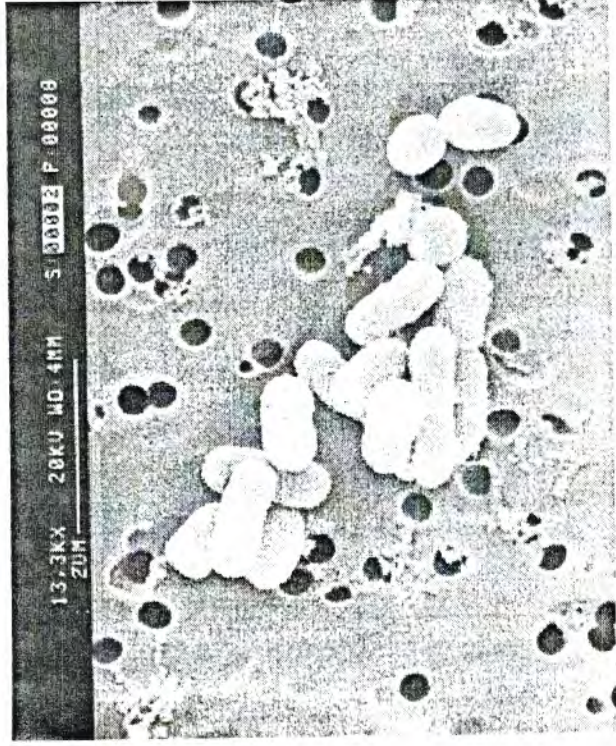
filaments; nous observons également la présence de cellules de forme ovale en amas (5, 6) ou en pleine division (4).

Toutes ces constatations nous mènent à penser que cette souche présente plusieurs types de morphologies, donc, il est possible qu'elle passe par différents stades au cours de sa croissance.

De plus, cette souche n'est pas un Actinomycète "vrai" car elle ne présente aucune similitude morphologique avec les Actinomycètes cités dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1974, 1989, 1994).

- Quant à la souche C25SM, les filaments ne sont pas très nets (figure 6b); ils sont en fait complètement nécrosés, c'est peut-être dû au traitement chimique de la culture avant d'effectuer la microscopie électronique. Les deux souches sont très fragiles. Nous remarquons également l'existence de cellules qui ressemblent à celles retrouvées chez la souche A125M.





Ces deux souches appartiennent-elles au même genre?

Ces deux souches se différencient entre elles uniquement par leur couleur, la première étant noire et la deuxième marron-orange.

Nos isolats présentent beaucoup de similitudes avec un groupe de bactéries connu sous le nom de bactéries métalliques (PRINGSHEIM, 1948) (voir Chapitre I). Les principaux genres qui composent ce groupe sont: *Gallionella*, *Metallogenium*, *Caulobacter* et *Kusnezovia*. Dans la 8ème édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les genres *Gallionella*, *Metallogenium*, *Caulobacter* et *Kusnezovia* sont classés dans le groupe Budding and/or Appendaged Bacteria, c'est à dire des bactéries qui bourgeonnent. Ce sont des genres à affiliation incertaine. Ces deux genres sont difficiles à départager et se caractérisent par des cellules qui excrètent des tiges assimilées à des filaments recouverts d'hydroxyde de métaux. Ces microorganismes ont des cycles de vie selon VAN ITERSON (1958) et BALASHOVA (1969).

Deux espèces sont citées pour le genre *Gallionella* :

- *G.ferruginera* (EHRENBERG, 1938)

- *G.filamenta*

Quant au genre *Metallogenium*, il est décrit par ZAVARIN et HIRSH comme suit:

les cellules sont coccoïdes, la germination se fait par bourgeonnement et il y a formation de corpuscules élémentaires qui forment par la suite des filaments.

DUBININA (1969-1970) et BALASHOVA (1969) ont découvert des similarités entre *Metallogenium* et les mycoplasmes. Ceci montre bien la difficulté d'identification de ces genres.

Deux espèces sont citées:

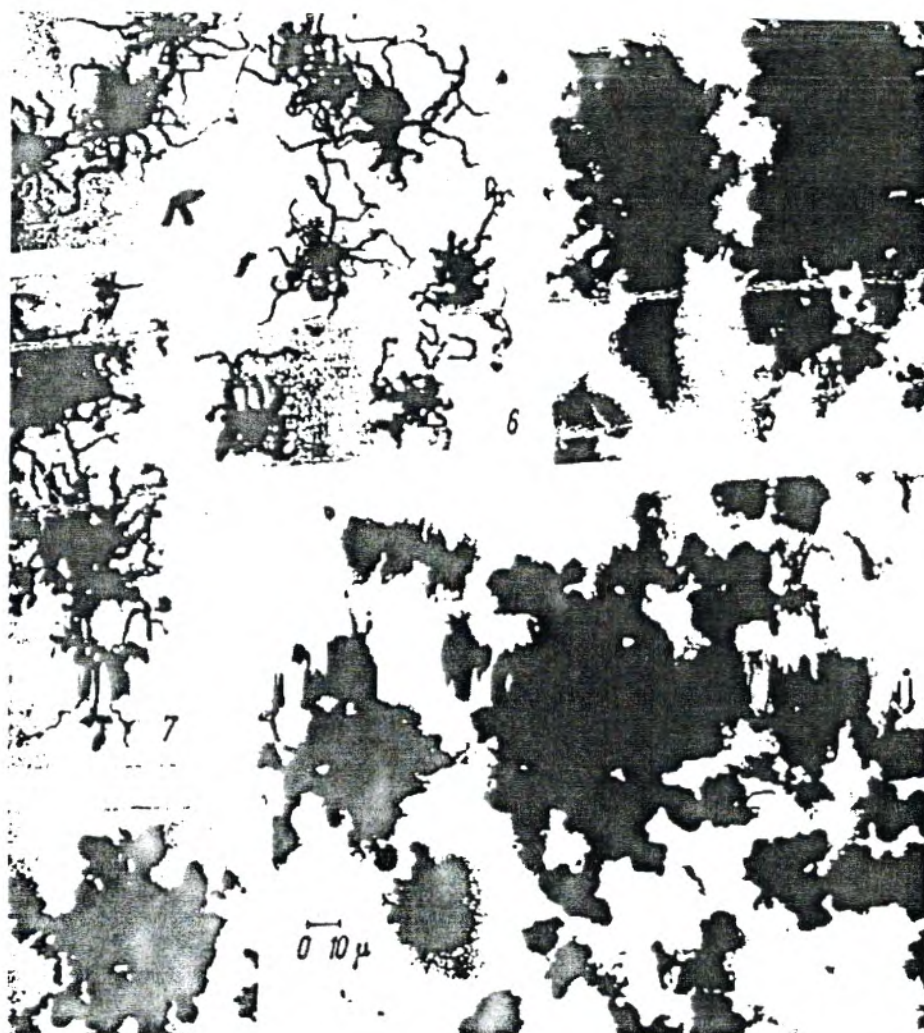
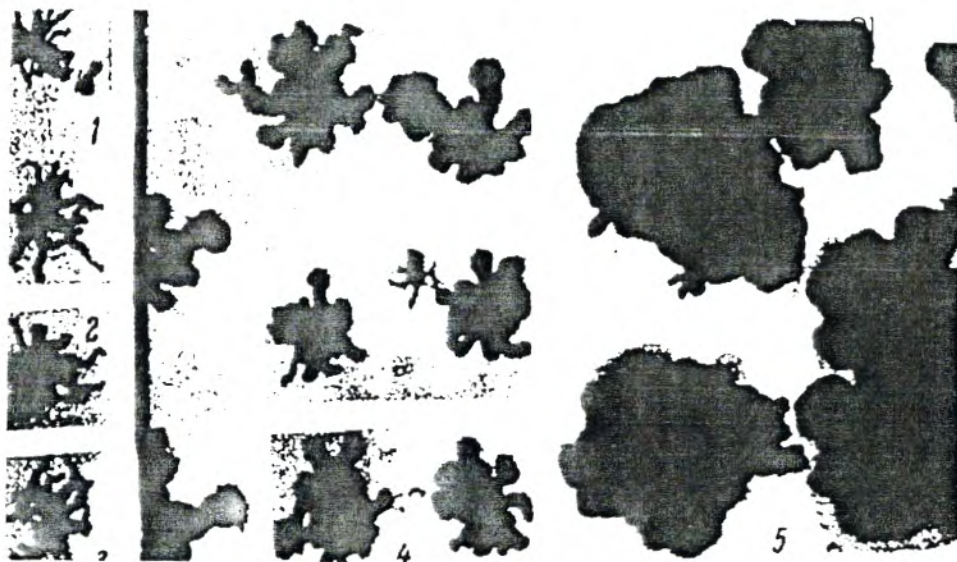
*Metallogenium personatum* (figure n°7)

*Metallogenium symbioticum*

Ces bactéries poussent très lentement en milieu artificiel; elles ont un Gram variable.

Jusqu'à récemment, il n'existe pas de publications décrivant des cultures pures de ces espèces. Par conséquent, la seule alternative qui nous restait est d'identifier nos souches en se basant sur leur morphologie et en les comparant aux genres présentant des similitudes dans notre bibliographie.

Nous avons comparé nos deux souches avec les genres les plus proches de nos isolats par différentes caractéristiques. Le tableau n° 20 constitue une synthèse des descriptions citées dans la littérature concernant ces différents genres.



**Figure 7 :** *Metallogenium personatum*. Microcolonies à différents stades d'incrustation de manganèse (1-3) ; (4) "Lobate" microcolonie (5) Microcolonie "tuberculate" (6-10) Différents stades d'incrustation NAUKA, Moskow, 1964, pp. 16-53 in Bergey's Manual of systematic bacteriology, 9<sup>e</sup> édition (1994).

▼ Forme araignée



Tableau n°20 : tableau comparatif des deux souches A125M et C25SM avec les genres de bactéries métalliques selon Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1974, 1989, 1994) et PRINGSHEIM (1948)

Caractéristiques Souches	Couleur	Type respiratoire	Temps d'incubation	Gram	Multiplication	Morphologie sur milieu synthétique	Lieu d'isolement	Forme des cellules
A125M	noire	micro-aérophile	3 à 4 semaines	? variable	division binaire Filaments qui irradient du centre → "araignée"	microcolonies en tête d'épingle	Lac d'El Goléa	ellipsoïdales à coccoïdes + filaments
C25SM	orange-marron	micro-aérophile	2 à 3 semaines	? variable	division binaire	microcolonies en tête d'épingle	Lac d'El Goléa (Boues)	ellipsoïdales à coccoïdes + filaments
<i>Gallionella</i> (2 espèces)	-	micro-aérophile	4 à 6 semaines	gram -	division binaire cellules avec flagelle	microcolonies	largement distribués dans les eaux fraîches	forme en rein ou ronde se terminant par de longues tiges
<i>Metallogenium</i> (2 espèces)	noire	micro-aérophile	4 à 6 semaines	gram variable	bourgeonnement Filaments qui irradient du centre → "araignée"	microcolonies sur milieu synthétique non obtenues en culture pure	eaux fraîches lacustres, plancton des lacs	cellules coccoïdes et filaments
<i>Ochrobium</i> (1 espèce)	brune	micro-aérophile capable de croître anaérobie		-	les cellules forment des agrégats de 8 cellules mobiles	-	eaux fraîches peu oxygénées	ellipsoïdales ou en bâtonnets en capsules imprégnées d'oxyde de fer
<i>Kusnezovia</i> (1 espèce)	noire ou brune	micro-aérophile	-	-	-	non cultivé en laboratoire	Lacs	cellules 1,5µm coccoïdes terminées par des filaments non mobiles
<i>Caulococcus</i> (1 espèce)	noire	micro-aérophile	-	-	bourgeonnement	non cultivé en laboratoire	Lacs	cellules coccoïdes 0,5µm connectées à des filaments Ø 0,1µm

- : non décrit

Nous pouvons conclure de la sorte:

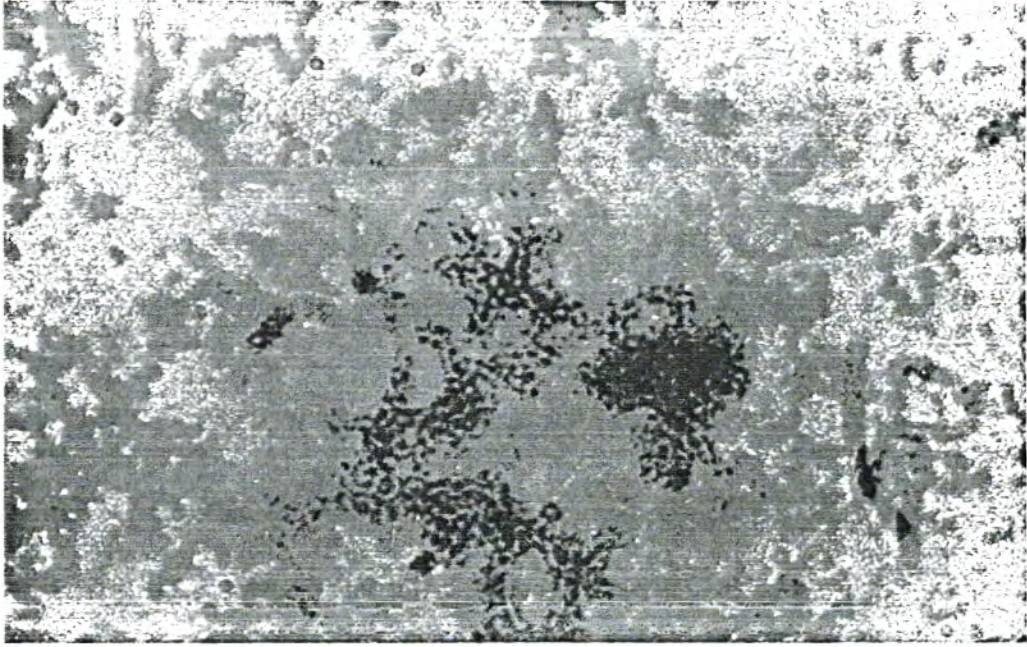
Il est clair que nos deux isolats n'appartiennent pas au groupe des Actinomycètes mais sont apparentés à ces derniers par leur caractère filamenteux. Les caractères culturaux sur les différents milieux ISP n'ont donné aucune orientation puisqu'ils poussent d'une manière identique sur ces milieux.

Si l'on se réfère au tableau comparatif que nous avons établi, nos deux souches ont beaucoup de similitude avec certaines bactéries métalliques.

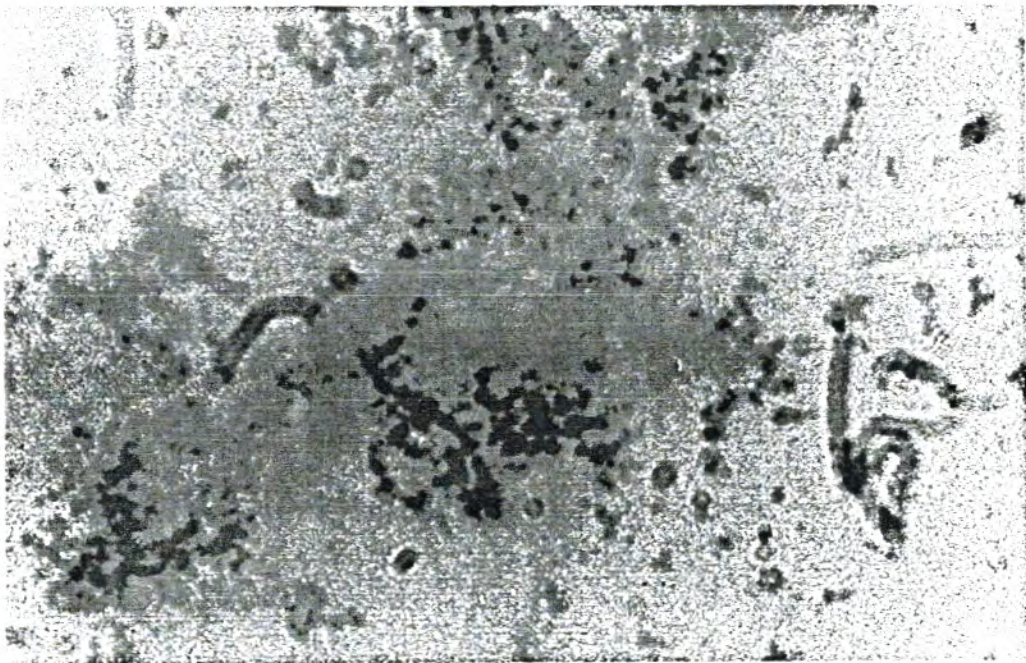
Elles présentent effectivement un Gram variable. Nous avons testé leur croissance sur un milieu Pringsheim et avons pu apprécier une biomasse relativement plus importante que celle obtenue avec le milieu ISP<sub>2</sub>.

Le Gram a été effectué pour les deux souches A125M et C25SM, cultivées sur milieu Pringsheim (planches 2 et 3).

Nous notons la taille microscopique de ces cellules. En somme, elles se présentent sous forme de micro-colonies, ont un Gram variable, sont microaérophiles.

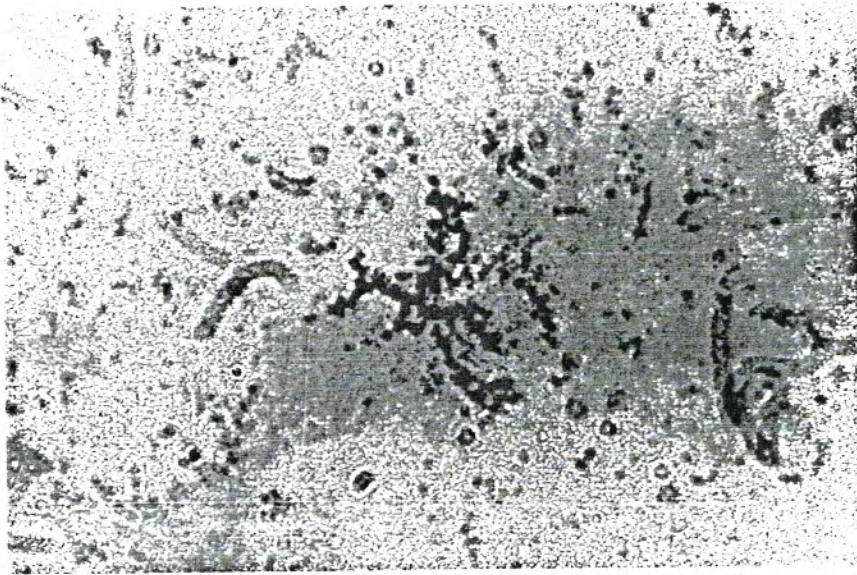


A125M

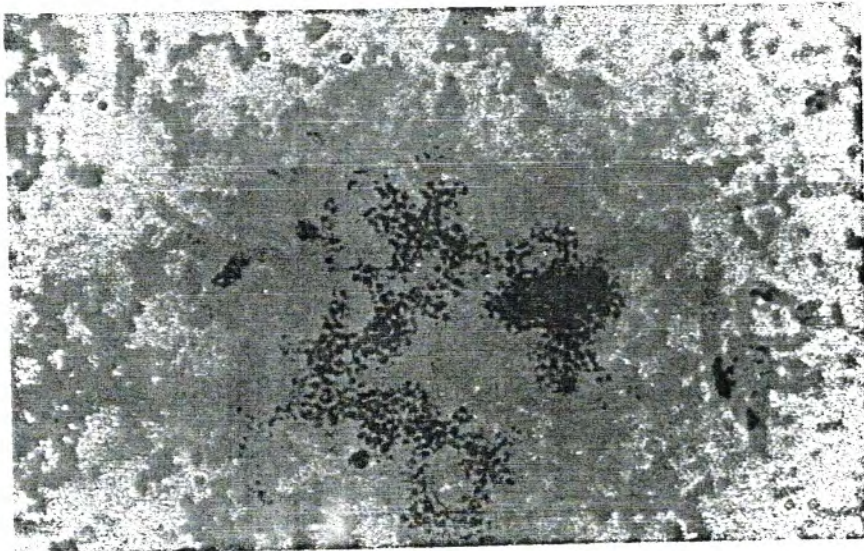


A125M

Planche 2



C25 SM



C25 SM

Planche 3

Les souches A125M et C25SM se rapprochent beaucoup du genre *Metallogenium*.

En particulier, la souche A125M qui présente la forme "araignée" (figure 6a Photo 1) très caractéristique du genre *Metallogenium*.

La figure n°7 montre d'une manière significative la ressemblance de la souche A125M avec ce genre.

Quant à la souche C25SM (voir figure 6b), elle est quasiment similaire à la souche A125M. Elle appartiendrait donc à ce genre.

La souche A125M présente beaucoup de points communs avec l'espèce *Metallogenium personatum*; quant à la souche C25SM, elle ne ressemble pas aux deux espèces de *Metallogenium* et pourrait être une nouvelle espèce.

La difficulté réside dans l'identification des bactéries métalliques qui est uniquement basée sur des critères morphologiques.

Il est certain que nos deux souches sont très particulières, extrêmement fragiles et très difficiles à conserver, et semblent appartenir au groupe "Iron Bacteria" et en particulier au genre *Metallogenium*.

## CHAPITRE III

# PRODUCTION, EXTRACTION ET PURIFICATION DE DEUX ANTIBIOTIQUES SECRETES PAR LES DEUX SOUCHES A125M ET C25SM

## 1 - INTRODUCTION

Nous étudions les antibiotiques produits par les deux souches de *Metallogenium* (A125M et C25SM), présentant respectivement une activité antifongique et antibactérienne.

Nous avons testé plusieurs milieux de production (Bouillon nutritif, milieu PRINGSHEIM et milieu ISP2); à cette étape, nous nous sommes contentés d'une recherche empirique, l'optimisation de la production n'étant pas le but recherché.

Par la suite, nous avons fait des essais d'extraction avec des solvants organiques de différentes polarités.

Avant de poursuivre la purification, nous avons effectué quelques tests préliminaires, en particulier la stabilité des molécules actives à diverses températures et valeurs de pH.

Les étapes de purification qui ont suivi l'extraction sont basées sur le principe de la chromatographie.

La première méthode de séparation et de purification est la chromatographie sur couche mince de silice.

Elle permet de repérer assez vite si une souche produit un ou plusieurs métabolites, en effectuant des bioautographies directement sur les chromatogrammes.

Nous pouvons effectuer parallèlement des révélations chimiques.

Cette méthode est, par la suite, transposée en chromatographie préparative d'acide silicilique qui permet de préparer les premières petites quantités de produits semi-purifiés.

La dernière étape de purification a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse.

Les petites quantités d'antibiotiques seront utilisées pour les études spectroscopiques.

S'agissant de deux souches particulières à tout point de vue, l'étude de la production s'avère très intéressante.

## **2 - MATERIEL ET METHODES**

### **2.1 Production d'antibiotiques en milieu liquide**

#### **2.1.1 Précultures**

Après différents essais sur les trois milieux de production choisis: le bouillon nutritif, milieu PRINGSHEIM et milieu ISP<sub>2</sub>. Le milieu ISP<sub>2</sub> est retenu bien que nous avons noté une croissance relativement plus importante dans le milieu PRINGSHEIM.

Les précultures sont préparées à partir des deux souches cultivées sur boîte (milieu ISP<sub>2</sub>). La surface de la gélose est raclée avec une anse stérile. L'inoculum est déposé dans un Erlenmeyer de 250ml contenant 50ml de milieu ISP<sub>2</sub> liquide (pH = 7 - 7,2).

L'incubation est effectuée sur une table d'agitation modèle Gallenkamp à 28°C et à 120 tours/mn pendant 05 jours. Ce sont les précultures qui seront utilisées pour inoculer les fioles en vue de la production d'antibiotiques.

#### **2.1.2 Cultures en fioles agitées**

Les souches A125M et C25SM sont cultivées dans les mêmes conditions que précédemment, dans des Erlenmeyers de 250ml, 500ml, contenant respectivement 50ml et 100ml de milieu ISP<sub>2</sub> liquide.

Les Erlenmeyers sont inoculés par la préculture à raison de 5% (V/V).

#### **2.1.3 Mesure de la production d'antibiotiques**

- Dans les cellules:

Pour extraire l'antibiotique et suivre sa production, les cellules sont récupérées après centrifugation de 100ml de culture, puis



traitées avec 25ml de méthanol pendant deux heures sous agitation à température ambiante.

100µl d'extrait méthanolique sont déposés sur les disques de papier.

La technique utilisée est celle des disques de papier.

- Dans le surnageant:

Un prélèvement est effectué quotidiennement pour mesurer l'activité du surnageant de culture. L'activité est déterminée par la méthode des puits. Ces derniers sont réalisés grâce à un emporte-pièce de 6mm de diamètre à partir du milieu ISP<sub>2</sub> préalablement ensemencé par le germe test et coulé dans des boîtes de Pétri.

## **2.2 Extraction des antibiotiques**

Après les cultures, les milieux sont centrifugés pour analyser séparément le surnageant des cellules.

### **2.2.1 Extraction à partir des cellules**

Une fois les cellules traitées avec du méthanol, après centrifugation, le surnageant est concentré dans un évaporateur rotatif sous vide, de type ROTAVAPOR-R (BUSHI) à 40°C. Le résidu est repris dans 5ml de méthanol et enfin testé par antibiographie.

### **2.2.2 Extraction à partir du filtrat**

Nous avons effectué des essais d'extraction de l'activité antibiotique avec des solvants de polarité différente (par ordre de polarité croissante), hexane, acétate d'éthyle, n-butanol.

Pour ce faire, plusieurs aliquotes de 100ml de filtrat sont extraites séparément avec 40ml de solvant.

Pour le choix du solvant, nous tenons compte du coefficient de partage K.

$$K = \frac{\text{Activité de la phase organique}}{\text{Activité de la phase aqueuse}}$$

### 2.3 Déshydratation de la phase organique, évaporation et vérification de l'activité antibiotique des extraits par antibiographie

La phase organique est deshydratée par passage sur sulfate de sodium anhydre.

La phase organique deshydratée est évaporée à l'évaporateur rotatif sous vide de type ROTAVAPOR-R (BUSHI) à 40°C. Le résidu est repris dans un minimum de méthanol.

Les extraits sont testés pour vérifier leur activité antibiotique par la technique des disques de papier ou antibiographie.

### 2.4 Etude de la stabilité des molécules actives

La stabilité des produits en fonction du pH, de la température et du mode de conservation est recherchée.

Elle a été effectuée à partir des extraits actifs.

#### 2.4.1 Stabilité en fonction du pH

4ml d'extrait actif sont additionnés de 2ml de méthanol. Nous ajustons le pH avec NaOH ou HCl 1N aux valeurs suivantes: 2, 5, 6, 8, 10, 12.

Les tubes sont conservés à température ambiante pendant des périodes allant de 24 heures à plusieurs semaines. Après avoir réajusté au pH voulu, nous avons testé l'extrait sur le germe-cible.

### **2.4.2 Stabilité à la chaleur**

Les extraits sont ajustés à leur pH optimal.

Des fractions de ces extraits sont soumises à des traitements thermiques, 30mn à 50°C et 80°C, 15mn à 100°C, autoclavage à 120°C pendant 20mn.

Après refroidissement, l'activité est comparée à celle d'un témoin conservé à température ambiante.

### **2.4.3 Stabilité au cours de la conservation dans différentes conditions**

Les extraits sont ajustés à leur pH optimal.

Des fractions de ces extraits sont conservées à température ambiante, 4°C, -5°C et -20°C.

L'activité est testée après conservation de plusieurs jours. Elle est comparée à celle d'un témoin laissé à température ambiante.

## **2.5 Séparation et purification**

### **2.5.1 Chromatographie analytique sur couche mince et bioautographie**

Nous avons utilisé des plaques de gel de silice (Kieselgel 60 F254, Merck) prêtes à l'emploi et préparé des plaques épaisses avec du gel de silice 60 G (Merck).

#### **- Chromatographies**

Les dépôts de petits volumes des extraits actifs sont déposés, sous forme de spots placés à 3cm du bord inférieur de la plaque et à 2cm des bords latéraux, par petites fractions, à l'aide d'une micropipette, et séchés sous un courant d'air froid entre chaque application.

Les différents systèmes éluants utilisés sont:

- N-butanol-acide acétique-eau (60:20:20, V/V)
- Chloroforme-méthanol-ammoniaque à 17% (2:1:1, V/V)
- Acétate d'éthyle-méthanol (100:15, V/V)
- N-propanol-pyridine-acide acétique-eau (15:35:45:5, V/V)

Les cuves utilisées contiennent 100ml de solvant. L'atmosphère des cuves est saturée pendant deux heures, avant d'y introduire les plaques de silice. La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a atteint 3cm du bord supérieur de la plaque. Ce dernier est noté dès le retrait de la plaque. Le solvant est éliminé par simple évaporation à température ambiante sous hotte.

Le chromatogramme est observé à l'oeil nu puis sous lumière ultraviolette ( $\lambda = 254$  et 356nm) et les tâches qui apparaissent sont relevées (absorption fluorescence).

- Révélation microbiologique des chromatogrammes

(Technique de bioautographie, BETINA, 1973)

Avant révélation, le chromatogramme est séché dans une étuve à 37°C pendant une nuit, placé ensuite sur un support en verre dans le fond d'une boîte en polyéthylène (22 x 24cm) stérile. Un volume de 50ml de gélose molle (Mueller Hinton, Sabouraud semi-liquide) en surfusion (45-50°C) est ensemencé en masse avec 2ml d'une suspension du germe-cible. Après homogénéisation, ce milieu est réparti à l'aide d'une pipette stérile sur toute la surface du chromatogramme. Un papier filtre imbibé d'eau est placé sur le fond de la boîte, afin de retarder la dessiccation rapide de la gélose.

La boîte est placée à 4°C une nuit afin de permettre la diffusion de l'antibiotique puis elle est incubée à 25°C pendant 24 à 48 heures.

Le  $R_f$  des zones d'inhibition est noté après incubation.

Le  $R_f$  (rapport frontal) des antibiotiques est alors calculé:

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration entre dépôts et tâches}}{\text{Distance de migration entre dépôts et front du solvant}}$$

#### - Révélation chimique

Parallèlement aux bioautographies, nous avons effectué des révélations chimiques sur des plaques ayant migré dans les mêmes conditions, afin d'établir des corrélations entre  $R_f$ , activité antibiotique et révélation chimique.

Les principaux révélateurs utilisés sont:

##### \* Révélateurs des sucres:

- $\alpha$  naphthol-acide sulfurique
- aniline-phtalate (réactif des sucres réducteurs)

##### \* Révélateurs des phénols:

- chlorure de fer (III)
- nitro4 aniline diazotée

##### \* Révélateurs des fonctions amines:

- ninhydrine
- vaniline-hydroxyde de potassium
- glucose-acide phosphorique

La composition et le mode d'utilisation sont donnés en annexe.

### 2.5.2 Chromatographie préparative sur plaques épaisses

Les techniques analytiques utilisées précédemment ont été transposées en techniques préparatives pour de petites quantités.

La préparation des plaques de gel de silice est comme suit: l'épaisseur du dépôt de gel de silice est fixée à 0,5mm sur l'appareil à étalement:

nous mélangeons 50g de gel de silice avec 100ml d'eau distillée. Après homogénéisation, le gel obtenu est versé immédiatement dans la cuve de l'appareil. Les plaques prêtes doivent être séchées 24 heures à température ambiante.

Avant utilisation, les plaques sont mises dans l'étuve à 100°C.

Après refroidissement, des dépôts de 500µl par plaque sont effectués à la micro-seringue sous forme de traits placés à 3cm du bord inférieur et à 1cm des bords latéraux.

Les dépôts sont séchés et les plaques chromatographiées avec l'éluant choisi.

Les plaques sont observées sous ultra-violet (366nm) afin de repérer les tâches fluorescentes.

Une bioautographie est préparée dans les mêmes conditions afin de situer l'antibiotique sur les plaques épaisses.

Ainsi, les zones actives sont récupérées par grattage de la silice.

Les extraits semi purifiés sont récupérés par dissolution de la poudre grattée dans 100ml de méthanol pur, sous agitation pendant 1 heure.

Le mélange est filtré sur verre fritté avec aspiration par vide à l'aide d'une trompe à eau jusqu'à l'obtention d'un filtrat limpide.

Le filtrat est évaporé à sec sous flux d'air comprimé.

Ces extraits seront soumis par la suite à d'autres analyses de purification, en l'occurrence la chromatographie liquide à haute performance ou HPLC.

### 2.5.3 Chromatographie liquide à haute performance ou HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance est la technique analytique la plus utilisée à l'heure actuelle.

La purification finale de l'antibiotique a été réalisée par HPLC.

L'appareillage utilisé est un chromatographe MILLIPORE WATERS qui comprend:

- . une vanne de sélection de solvant à 4 voies WATERS SSV
- . une pompe et un injecteur MODEL 590
- . une précolonne GUARD-PARK  $\mu$  BONDAPAK C18
- . une colonne semi-préparative DELTAPAK C18-300<sup>0</sup>  
(7,8mm x 30cm, 15 $\mu$ , sphérique)
- . un détecteur spectrophotométrique U.V visible  
LAMBDA - MAX MODEL 481
- . un enregistreur-intégrateur MODEL 740 DATA MODULE.

Les conditions expérimentales étaient les suivantes:

l'éluant était un gradient discontinu eau-méthanol (eau ultrapure)  
(exemple de gradient discontinu: 30-50-80-100% de méthanol).

L'échantillon à injecter initialement sec est repris dans 1,5ml de méthanol pur pour HPLC.

L'échantillon est filtré au travers d'un filtre 0,45 $\mu$ m de porosité (MILLIPORE).

L'injection d'1ml de l'échantillon est effectuée avec une microseringue de 500 $\mu$ l.

Le débit de l'éluant est de 2ml/mn.

La détection a été effectuée à 220nm.

Les différentes fractions récoltées sont évaporées à sec sous flux d'air comprimé puis sont récupérées dans 1ml de méthanol pour être testées par antibiographie. L'antibiographie nous permet de déterminer à quel pourcentage méthanol-eau sort l'antibiotique.

Après cela, nous affinons le gradient pour purifier la fraction active.

## 2.6 Etude spectroscopique des antibiotiques Purifiés

### 2.6.1 Etude du spectre ultra-violet (u.v) visible ( $\lambda > 400\text{nm}$ )

Nous avons effectué les différents spectres de l'U.V visible de toutes les fractions éluées et extraites des chromatogrammes après HPLC.

Le spectrophotomètre utilisé est du type: SHIMADZU U.V 260.

### 2.6.2 Absorption infra-rouge (i.r) ( $\lambda > 0,8\mu\text{m}$ )

L'appareillage utilisé est un spectrophotomètre du type: SHIMADZU I.R 470.

Nous avons choisi une fraction pour chaque extrait et nous avons effectué respectivement les spectres IR.

Pour cela, nos échantillons se présentaient sous forme solide: placés dans des pastilles à 1% de bromure de potassium (KBr).

### 2.6.3 Purification ultime de l'extrait C<sub>125</sub>

La spectrométrie de masse exige l'analyse d'une substance qui soit pure.

Vue la faible quantité des composés récoltée pour chacune des deux souches, et pour des raisons techniques, nous avons choisi la fraction C<sub>125</sub> du produit C<sub>1</sub> sécrété par la souche C<sub>25SM</sub> pour réaliser le



spectre de masse. Dans un premier temps, nous avons purifié ce composé au stade le plus avancé possible. Pour cela, nous avons travaillé sur une HPLC différente de la précédente, qui est plus performante puisqu'elle donne les spectres U.V visible en parallèle des pics des spectres d'HPLC.

Les références de cette HPLC sont les suivantes:

HPLC: SPECTRA PHYSICS

Un détecteur: SPECTRA FOCUS photodiodearray UV-VIS.

Une pompe: SPECTRAPHYSICS Sp8800 ternary HPLC pump.

### **3 - RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **3.1 Production d'antibiotiques en milieu liquide**

Nous avons montré dans le chapitre précédent que la souche A125M présentait une activité antifongique spécifique, dirigée sur *Candida albicans*, alors que la souche C25SM était active sur les bactéries.

De ce fait, *Candida albicans* est la levure cible retenue pour les différents tests d'activité tout au long de cette étude de par sa forte sensibilité à l'antibiotique produit par la souche A125M.

Quant à *Bacillus subtilis*, elle a été retenue pour les mêmes raisons que la précédente pour la souche C25SM.

Les souches A125M, C25SM ont été cultivées sur milieu ISP<sub>2</sub> liquide en fioles agitées pendant 14 jours. La production d'antibiotiques a été suivie quotidiennement par la méthode des puits.

Le tableau n°21 et les graphiques regroupent les résultats des différents tests effectués (figure n°8).

Tableau n° 21 : Cinétique de la production d'antibiotiques en milieu  
liquide par les souches A125M et C25SM  
(méthode du puits)

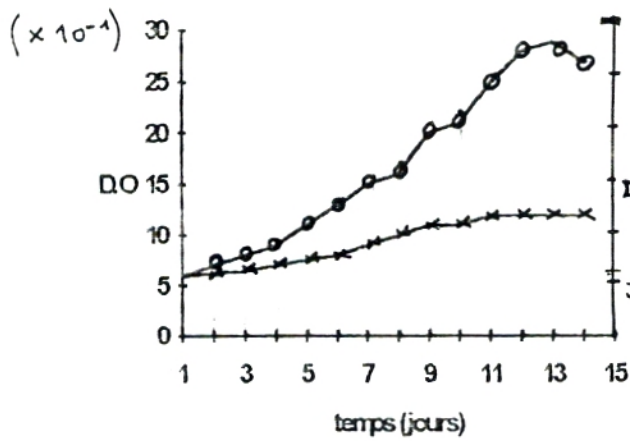
Souches	Activités	Jours d'incubation													
		1 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	3 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	5 <sup>e</sup>	6 <sup>e</sup>	7 <sup>e</sup>	8 <sup>e</sup>	9 <sup>e</sup>	10 <sup>e</sup>	11 <sup>e</sup>	12 <sup>e</sup>	13 <sup>e</sup>	14 <sup>e</sup>
A125M	C.alb	-	-	-	-	-	8	9	10	11	11	12	12	12	12
C25SM	B.subt	-	-	-	-	8	10	11	12	14	15	15	15	15	15

\* Activités des milieux extracellulaires bruts

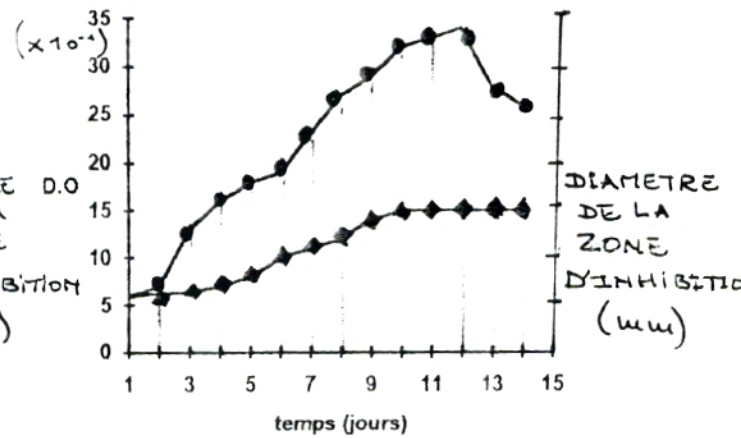
\* Zones d'inhibition exprimées en mm, celui du puit:6mm

\* C.alb: *Candida Albicans*

\* B.subt: *Bacillus subtilis*



-a-



-b-

Figure n° 8

Croissances et activités des souches A125M et C25SM

a - Croissance et activité de la souche A125M

b - Croissance et activité de la souche C25SM

Les cinétiques mentionnées dans le tableau n° 21 et la figure n° 8 mettent en relief la croissance très lente de chacune des deux souches; quant à la production des antibiotiques, les produits sont excrétés au cours de la phase stationnaire. Pour la souche A125M, cela se stabilise au cours du 11<sup>ème</sup> jour et la souche C25SM au cours du 10<sup>ème</sup> jour. Nous n'avons pas pu réaliser la courbe montrant l'évolution de la biomasse en fonction de la densité optique. Ceci est dû à la difficulté d'obtenir une biomasse importante ou un trouble homogène.

### 3.2 Extraction de l'activité antibiotique en milieu liquide

Après croissance des souches A125M et C25SM sur milieu ISP<sub>2</sub> liquide, les milieux sont centrifugés à 8000 tours pendant 15mn afin de récupérer séparément les cellules et le filtrat (surnageant). Aucune activité n'a été retrouvée dans les extraits méthanoliques des cellules.

Les produits synthétisés par ces deux souches sont excrétés dans le filtrat (surnageant).

Le filtrat a subi des extractions avec différents solvants (N-butanol, acétate d'éthyle, hexane) afin de mettre en évidence l'activité antibiotique extracellulaire.

Après chaque extraction, la phase organique et la phase aqueuse non concentrées ont été testées par antibiographie (à raison de 100µl par disque).

Les activités ont été retrouvées dans les extraits butanoliques et les extraits d'acétate d'éthyle comme le montre le tableau n° 22.

Tableau n° 22 : Résultats des antibiographies réalisées à partir de  
trois solvants sur *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*

Souches	Germes cible	n butanol		Acétate d'éthyle		Hexane	
		$\rho_{aq}$	$\rho_{org}$	$\rho_{aq}$	$\rho_{org}$	$\rho_{aq}$	$\rho_{org}$
A125M	1	0,7	1,3	0,8	1,6	1,2	-
C25SM	2	0,9	2,1	1,1	2	1,8	-

\*  $\rho_{aq}$  : phase aqueuse  
\*  $\rho_{org}$  : phase organique

\* 1: *Candida albicans*  
\* 2: *Bacillus subtilis*

Après calcul du coefficient de partage  $K$ , nous avons choisi l'acétate d'éthyle ( $K > 1$ ) pour la culture en grand volume.

Il est à noter que l'acétate d'éthyle est moins polaire que le butanol, et par conséquent, permet d'extraire moins de substances indésirables.

Aucune activité n'a été retrouvée dans les extraits d'hexane; ceci nous mène à déduire que nos antibiotiques sont probablement polaires.

### **3.2.1 Stabilité des molécules actives**

Après concentration des deux extraits, il s'est avéré que l'extrait provenant de la souche C25SM est soluble dans l'eau et dans le méthanol; quant au deuxième extrait, il est uniquement soluble dans du méthanol. Ceci confirme les résultats que nous avons obtenus précédemment avec l'hexane solvant apolaire.

La stabilité de l'activité a été testée après diverses méthodes de conservation et divers traitements.

- l'extrait provenant de la souche C25SM:

l'activité est stable dans l'intervalle  $\text{pH} = 2$  à  $\text{pH} = 10$  et au delà, l'activité diminue, avec un optimum  $\text{pH} = 6$ .

Cette activité est retrouvée à température ambiante et à  $40^\circ\text{C}$ , mais elle est complètement détruite au delà de cette température. Donc, le produit est thermolabile.

- l'extrait provenant de la souche A125M:

l'activité est stable pour un  $\text{pH}$  compris entre 2 et 8.

L'activité soumise à la chaleur est relativement instable, à  $120^\circ\text{C}$ , elle est complètement détruite.

Les deux extraits sont stables à  $-5^\circ\text{C}$  et  $-20^\circ\text{C}$ .

Leur conservation s'est donc faite à  $-5^\circ\text{C}$ .

### 3.3 Séparation et purification des antibiotiques produits par les souches A125M et C25SM

#### 3.3.1 Chromatographie sur couche mince

Nous avons utilisé la chromatographie sur plaques de silice dans un but analytique et préparatif.

Les couches minces permettent de réaliser, après la séparation, directement sur les plaques des bioautographies et des révélations physiques (absorption ou fluorescence aux U.V) et chimiques.

Les extraits du filtrat de chacune des deux souches (A125M et C25SM) ont été chromatographiés sur des plaques de Kieselgel 60F254 dans différents systèmes de solvants. Les valeurs de  $r_f$  sont calculées à partir des chromatogrammes révélés par bioautographie (*Candida albicans*, *Bacillus subtilis*).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau n° 23 et montrent que dans le système n-butanol-acide acétique-eau, la zone d'inhibition du filtrat de la souche A125M est retrouvée. Les autres systèmes n'ont pas permis la séparation des fractions de l'antibiotique produit par la souche A125M.

Nous retiendrons ce système de solvants pour la suite de notre travail.

Dans l'extrait du filtrat de la souche C25SM, trois zones d'inhibition à  $r_f$  différents sont retrouvées dans le système chloroforme-méthanol-ammoniaque et dans le système n-butanol-acide acétique-eau.

Nous avons également retenu le système n-butanol-acide acétique-eau pour ce deuxième extrait.

Tableau n° 23 : Comportement sur couche mince de gel de silice des  
 extraits d'acétate d'éthyle des deux souches  
 A125M et C25SM

Systèmes de solvants	Rf des zones d'inhibition	
	A125M	C25SM
Chloroforme-méthanol-ammoniaque	0	0,63 0,86 0,93
éthanol-acide acétique-eau	0	0
Propanol-pyridine-acide acétique-eau	0	0
Butanol-acide acétique-eau	0,72	0,62 0,69 0,79



Une première révélation microbiologique dirigée contre *Candida albicans* a été effectuée sur l'extrait à l'acétate d'éthyle du filtrat de la souche A125M et une deuxième contre *Bacillus subtilis* sur l'extrait à l'acétate d'éthyle du filtrat de la souche C25SM.

Les chromatogrammes ont été réalisés à partir de dépôts de 20µl pour les deux extraits et ont été développés par le système butanol-acide acétique-eau.

L'observation aux ultra-violets à ondes longues a mis en évidence:

- pour la souche A125M:

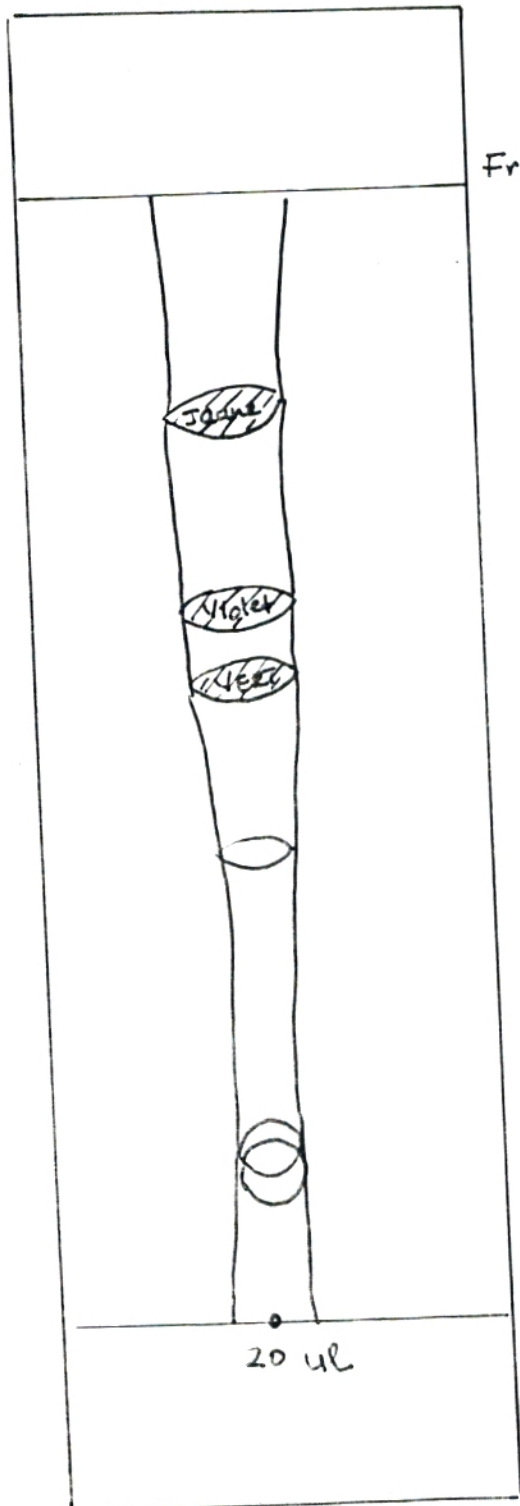
Trois tâches fluorescentes: violette, verte et jaune de  $R_f = 0,60$  ,  
 $R_f = 0,66$  et  $R_f = 0,76$ .

La zone d'inhibition de la levure n'est pas située aux mêmes  $R_f$  mais entre les deux dernières tâches de  $R_f = 0,72$ .

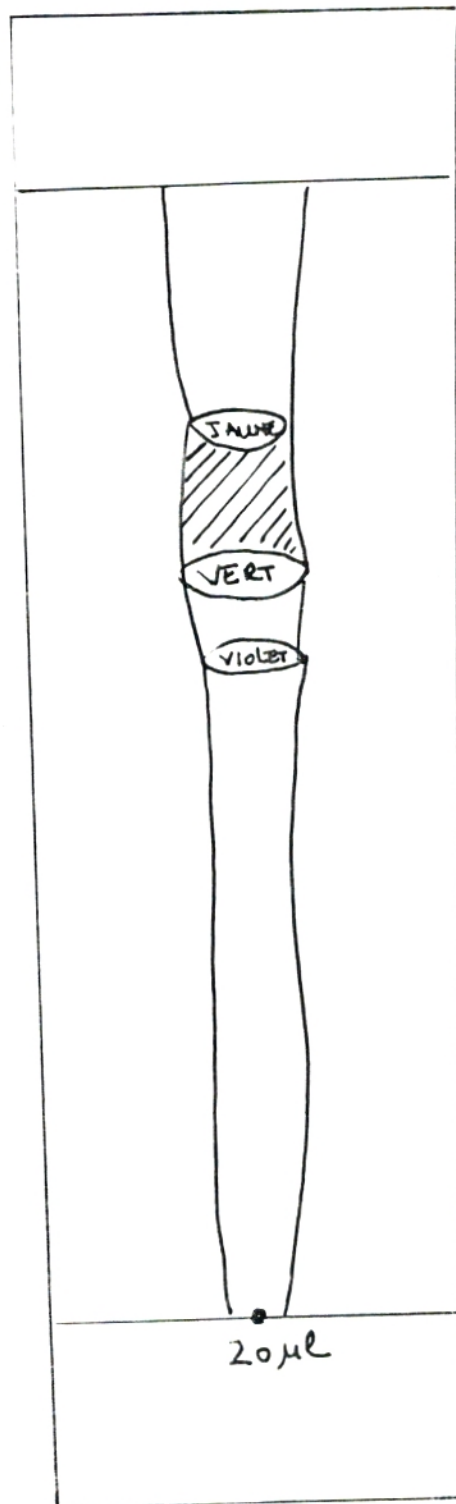
- pour la souche C25SM:

Trois tâches fluorescentes: verte, violette et jaune de  $R_{f1} = 0,62$  ,  
 $R_{f2} = 0,69$  et  $R_{f3} = 0,79$ .

Les zones d'inhibition de la bactérie se situent aux mêmes  $R_f$ , comme le montre la figure n°9, donc elle produirait au moins trois substances différentes.



C25SM



A125M

Figure n°9

Autobiographie

- hachuré : les zones actives
- couleurs observées sous U.V
- dépôts observés à l'oeil nu

Des révélations chimiques ont été menées en parallèle avec les révélations microbiologiques sur des plaques ayant migré dans les mêmes conditions.

Nous avons utilisé trois réactifs:

Le réactif des sucres:  $\alpha$  naphtol-acide sulfurique.

Le réactif des amines: ninhydrine.

Le réactif des phénols: solution de paranitroaniline diazotée.

Les résultats des révélations chimiques sont donnés dans le tableau n° 24.

Tableau n°24 : Résultats des révélations chimiques des antibiotiques  
sécrétés par les deux isolats A125M et C25SM

Antibiotiques	Révélateurs chimiques		
	$\alpha$ Naph-Sul	Nin	PAN
B <sub>2</sub> (A125M)	Violette foncée	Rose à violette	-
C <sub>1</sub> ,C <sub>2</sub> ,C <sub>3</sub> (C25SM)	Violette foncée	Rose à violette	Brun jaunâtre

- Note:
- = réaction chromogénique négative
  - $\alpha$  Naph-Sul :  $\alpha$  naphthol-acide sulfurique
  - Nin : Ninhydrine
  - PAN : Solution de paranitroaniline diazotée

L'antibiotique B<sub>2</sub> (souche A125M) de rf = 0,72, ainsi que les antibiotiques C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> (souche C25SM) de rf respectifs : 0,62 ; 0,69 ; 0,79, se révèlent positivement avec la ninhydrine et l' $\alpha$ -naphtol-acide sulfurique, révélateurs des fonctions amines et des sucres tandis que les phénols sont révélés uniquement chez C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>.

### 3.3.2 Chromatographie sur plaques épaisses

Les résultats des chromatographies analytiques ont été transposés sur plaques épaisses de Kieselgel G avec le même éluant (Butanol-acide acétique-eau).

Les zones actives de chacune des deux souches sont grattées puis récupérées dans du méthanol.

Les composés obtenus nommés B<sub>2</sub> pour la souche A125M, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> pour la souche C25SM, seront analysés par HPLC.

### 3.3.3 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La purification finale des extraits bruts des deux souches obtenus précédemment a été réalisée par HPLC avec une colonne semi-préparative C<sub>18</sub> Deltapak (Waters).

Nous avons choisi un premier gradient de méthanol-eau pour réaliser un profil global qui permet de situer à quel pourcentage de méthanol dans l'eau sort l'antibiotique.

Le gradient discontinu a été : 30, 50, 80 et 100% de méthanol pur dans l'eau ultra pure.

#### - Le produit B<sub>2</sub> (Souche A125M)

L'injection a été effectuée avec 1ml de produit repris dans du méthanol.

Le produit B<sub>2</sub> est de couleur jaune très pâle. Chaque fraction de ce produit est récoltée dans des flacons après chaque mélange méthanol-eau puis testée par antibiographie contre *Candida albicans*.

Les résultats de l'antibiographie montrent deux activités différentes: l'une est éluée avec 30% de méthanol et l'autre à 100% de méthanol. Il s'agit donc de deux produits différents. Ces deux activités sont uniquement dirigées sur *Candida albicans* avec des zones d'inhibition égales respectivement à 9 et 11mm, ce qui est cohérent avec nos résultats précédents. Le spectre du produit injecté est présenté dans la figure n°10.

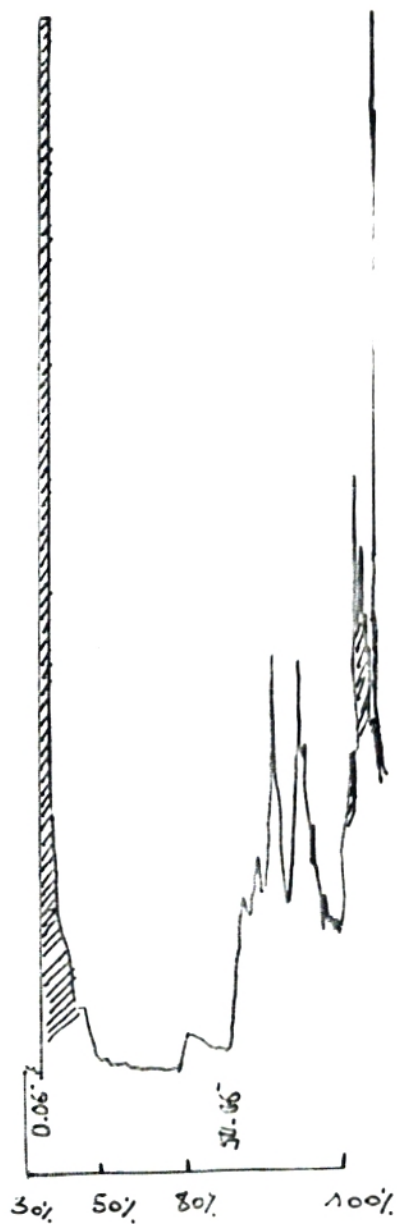


Figure n°1.0

Profil d'éluion par HPLC du produit B<sub>2</sub> (zone de rf = 0,72)

\* Conditions : - solvant d'injection : méthanol 100%

- volume d'injection : 2ml

- solvant d'éluion : mélange méthanol-eau 30%-50%-80%-100%

- débit : 2ml/mn

- détection : U.V à 220 nm

- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>

\* Les zones hachurées correspondent aux fractions actives.

La fraction récoltée à 30% a été réinjectée, afin de confirmer l'existence d'une fraction active et mettre en évidence le deuxième pic qui n'apparaissait pas à priori car le premier pic correspond à la sortie du méthanol (voir figure n°11).

La figure n°11 montre bien un deuxième pic après le pic du méthanol.

Nous avons ensuite affiné le gradient méthanol-eau afin d'avoir une meilleure séparation.

Le gradient affiné était le suivant: 25-50-75 et 100% de méthanol.

Nous avons réinjecté l'extrait B<sub>2</sub> en utilisant ce dernier gradient.

Nous avons obtenu le spectre suivant (figure n°12).





Figure n°11

Profil d'éluion en HPLC de la fraction active sortie à 30%

- éluant : méthanol-eau 30%
- détection : U.V à 220 nm
- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>

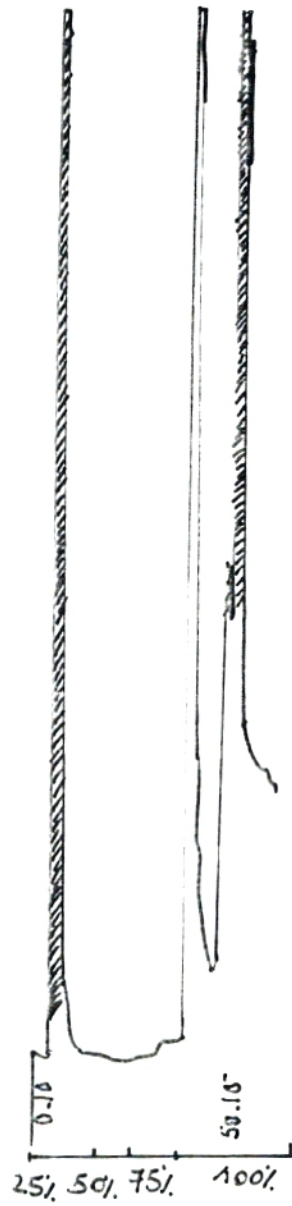


Figure n° 1 2

Profil d'élution en HPLC du composé B<sub>2</sub> (HPLC finale)

- éluant : mélange méthanol-eau 25%-50%-75%-100%
- débit : 2ml/mn
- détection : U.V à 220 nm
- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>

L'antibiographie réalisée sur les différentes fractions a montré que l'activité antibiotique est retrouvée à 25% et à 100% (les 4 pics récoltés séparément).

Les zones d'inhibition mesurées sont respectivement 10mm, 13mm, 8mm, 11mm.

Conclusion:

Puisque l'activité est retrouvée à 25% et 100%, l'extrait B2 est donc constitué de deux produits, dont un est fractionné en quatre dérivés.

Les fractions actives sont nommées comme suit:

25%	→	B 25	
100%	→	B '100	{ B'101 B'102 B'103 B'104

- Spectre U.V visible de l'extrait purifié B<sub>2</sub>:

Toutes les fractions récoltées se présentent sous forme de dépôt blanchâtre et après solubilisation dans le méthanol, elles sont toutes incolores.

L'étude spectrophotométrique dans le visible a été effectuée pour une absorption entre 200 et 400µm sur toutes les fractions actives. Les spectres U.V visible sont donnés par la figure n°13.

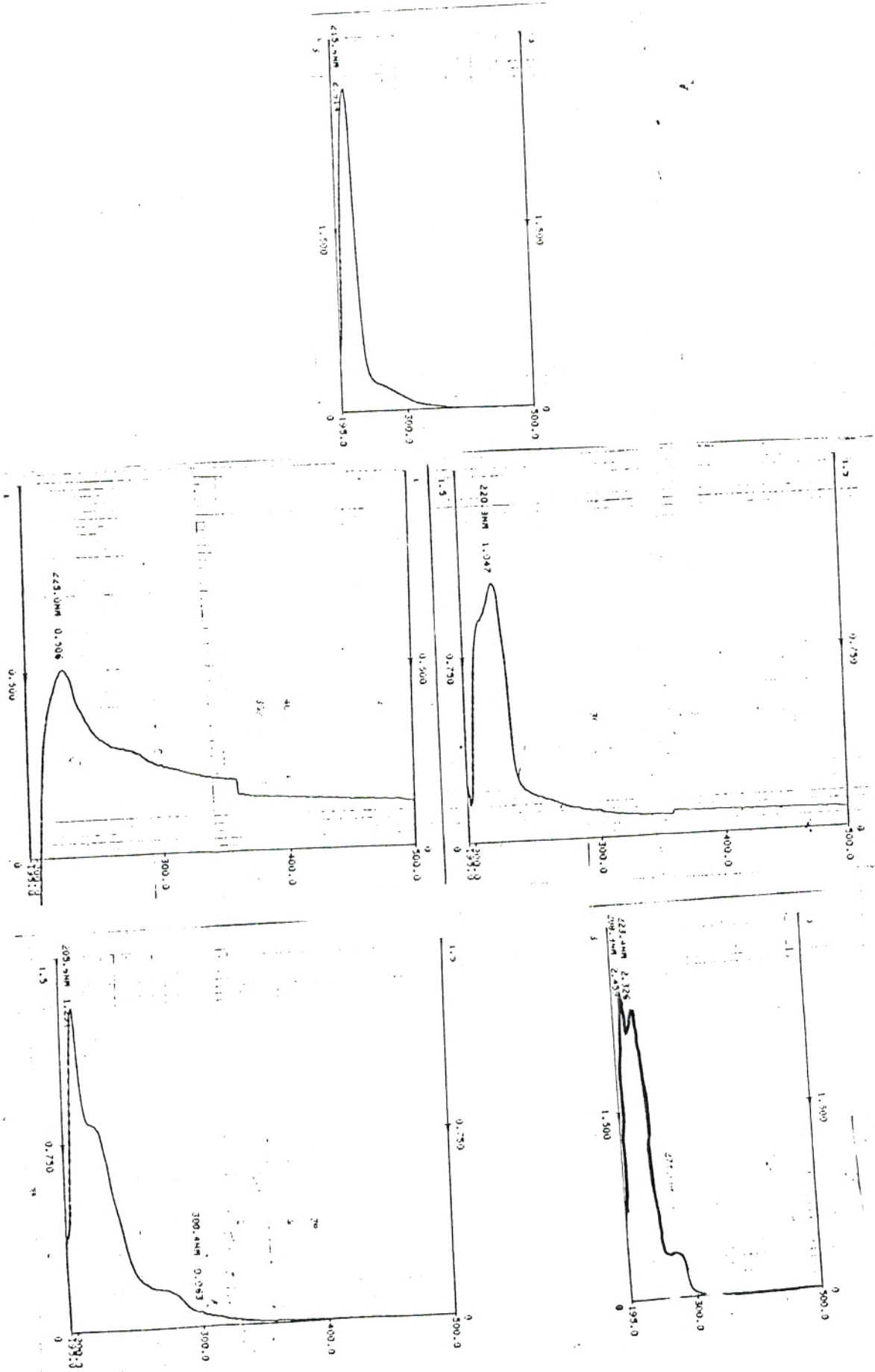


Figure n° 13  
Spectres U.V visible de l'extrait purifié B<sub>2</sub>

- Les produits C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>: (Souche C25SM)

\* Le produit C<sub>1</sub>: Cet extrait correspond à la tâche de Rf = 0,62 et il est coloré en jaune.

La première injection de cet extrait (1,5ml) au gradient méthanol-eau: 30, 50, 80 et 100% nous a donné le spectre suivant (figure n° 14).

Les différentes fractions récoltées à 80% et 100% de méthanol ont été testées par antibiographie, le germe-test étant *Bacillus subtilis*.

Les résultats de l'antibiographie mettent en évidence deux produits: le premier est élué à 80% et le second à 100%. Les zones d'inhibition exprimées en mm sont les suivantes:

80% (2 pics): 10 et 12

100% (2pics): 8 et 9

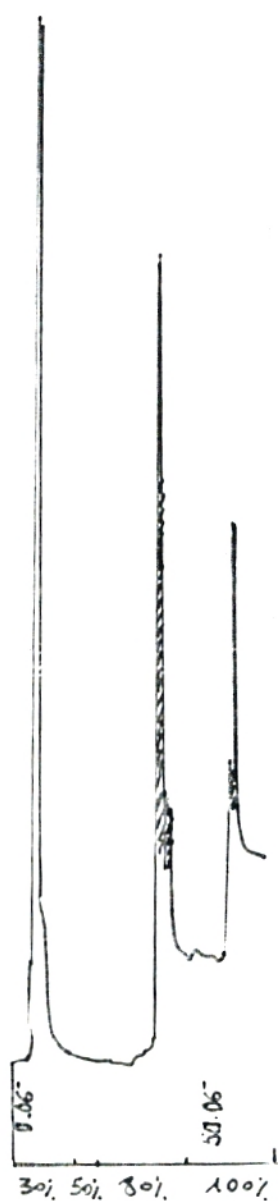


Figure n°14

Profil d'élution par HPLC du produit C<sub>1</sub> (zone de rf = 0,62)

\* Conditions : - solvant d'injection : méthanol 100%

- volume d'injection : 1,5 ml

- solvant d'élution : mélange méthanol-eau 30%-50%-80%-100%

- débit : 2ml/min

- détection : U.V à 220 nm

\* Les zones hachurées correspondent aux fractions actives contre *Bacillus subtilis*.

Nous avons effectué une deuxième injection (0,8ml) de cet extrait à un gradient méthanol-eau affiné, soit: 25-50-75 et 100%.

Nous avons obtenu le spectre représenté par la figure n° 15.

Toutes les fractions récoltées à 25%, 75% et 100% (3 pics) présentent une activité antibactérienne et en particulier contre *Bacillus subtilis*.

Nous étudierons par la suite le spectre U.V visible des différentes fractions du produit C<sub>1</sub>: soit C<sub>1</sub>25, C<sub>1</sub>75, C<sub>1</sub>101, C<sub>1</sub>102 et C<sub>1</sub>103.

L'étude spectrophotométrique a donné les résultats représentés par la figure n° 16.



Figure n° 15

Profil d'élution par HPLC du produit C<sub>1</sub> après affinement du gradient (HPLC finale)

- éluant : mélange méthanol-eau 25%-50%-75%-100%
- débit : 2ml/mn
- détection : U.V à 220 nm
- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>



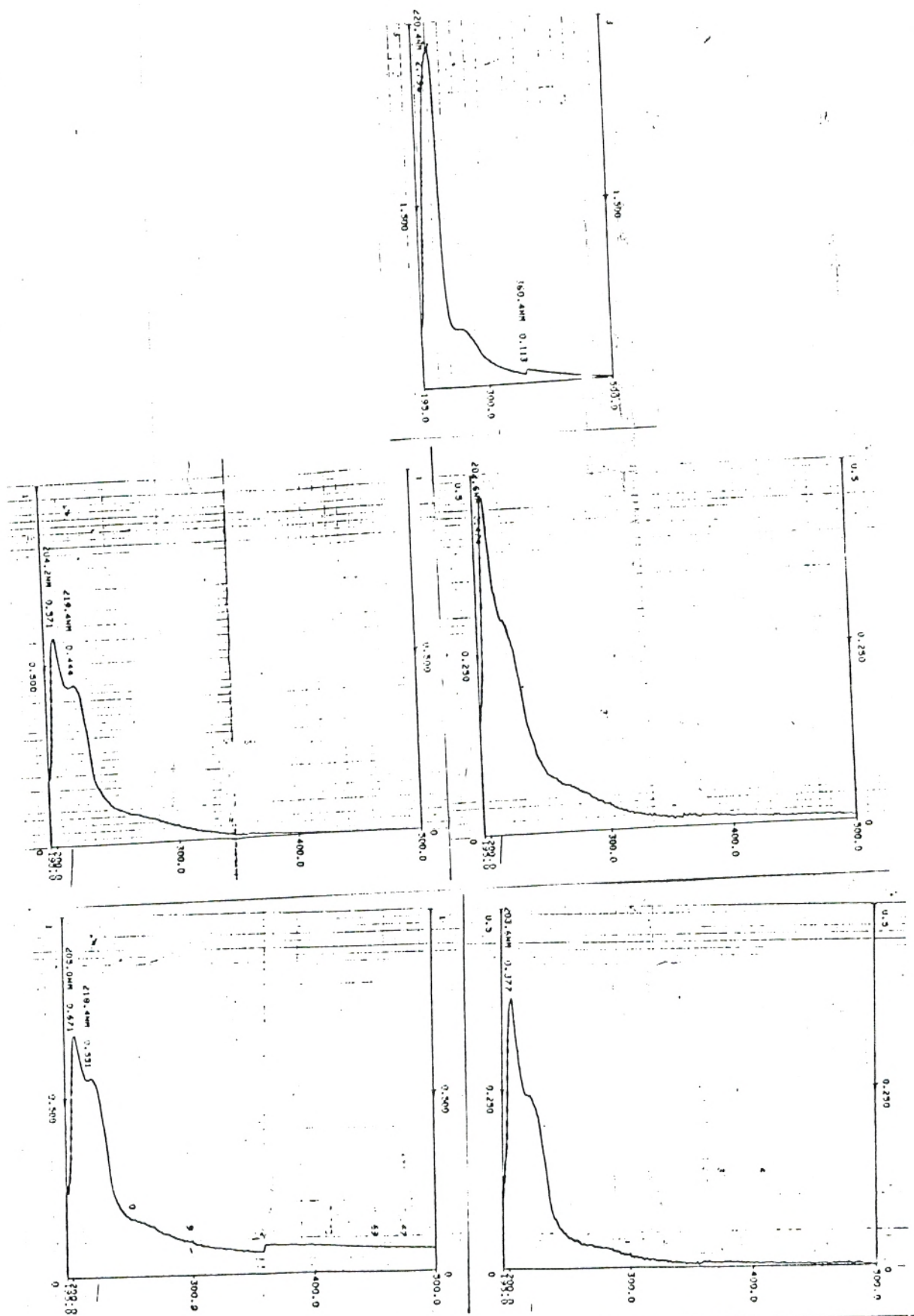


Figure n° 16  
 Spectres U.V visible des fractions de l'extrait purifié C<sub>1</sub>

\* Le produit C<sub>2</sub>: Nous avons suivi les mêmes étapes que précédemment. Il correspond à la tâche de Rf = 0,69 et est également coloré en jaune.

Un premier gradient méthanol-eau global: 30-50-80 et 100% a été utilisé pour l'injection d'environ 1,8ml du produit C<sub>2</sub>.

Le spectre obtenu est donné dans la figure n° 17.



Figure n° 17

Profil d'éluion du produit C<sub>2</sub> (zone de rf = 0,69)

\* Conditions : - solvant d'injection : méthanol 100%

- volume d'injection : 1,8 ml

- solvant d'éluion : mélange méthanol-eau 30%-50%-80%-100%

- débit : 2ml/mn

- détection : U.V à 220 nm

- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>

\* Les zones hachurées correspondent aux zones actives.

Les fractions récoltées aux différents mélanges méthanol-eau sont testées par antibiographie. Nous avons noté l'activité des fractions sur *Bacillus subtilis* à 80% et à 100%. les zones d'inhibition correspondantes sont 9mm et 12mm.

Nous avons continué l'étape purification du produit C<sub>2</sub> en affinant le gradient à: 25-50-75 et 100%.

Une injection de 1,5ml de produit nous a permis d'obtenir le spectre représenté dans la figure n° 18.

Les fractions sortant à 25% et à 75% de méthanol-eau sont actives sur *Bacillus subtilis*. Elles sont désignées comme suit: C<sub>2</sub>25, C<sub>2</sub>175 et C<sub>2</sub>275.

Nous obtenons deux pics à 75% de méthanol comme le montre la figure n° 18.



Figure n° 18

Profil d'élution par HPLC du produit C<sub>2</sub> après affinement du gradient (HPLC finale)

- éluant : mélange méthanol-eau 25%-50%-75%-100%
- débit : 2ml/mn
- détection : U.V à 220 nm
- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>

- Spectres U.V visible des fractions actives de l'extrait C<sub>2</sub> purifié:

Toutes les fractions récoltées (à 25% et 75%), solubilisées dans du méthanol, sont incolores.

Les spectres U.V visible de chacune de ces fractions sont représentés dans la figure n° 19.

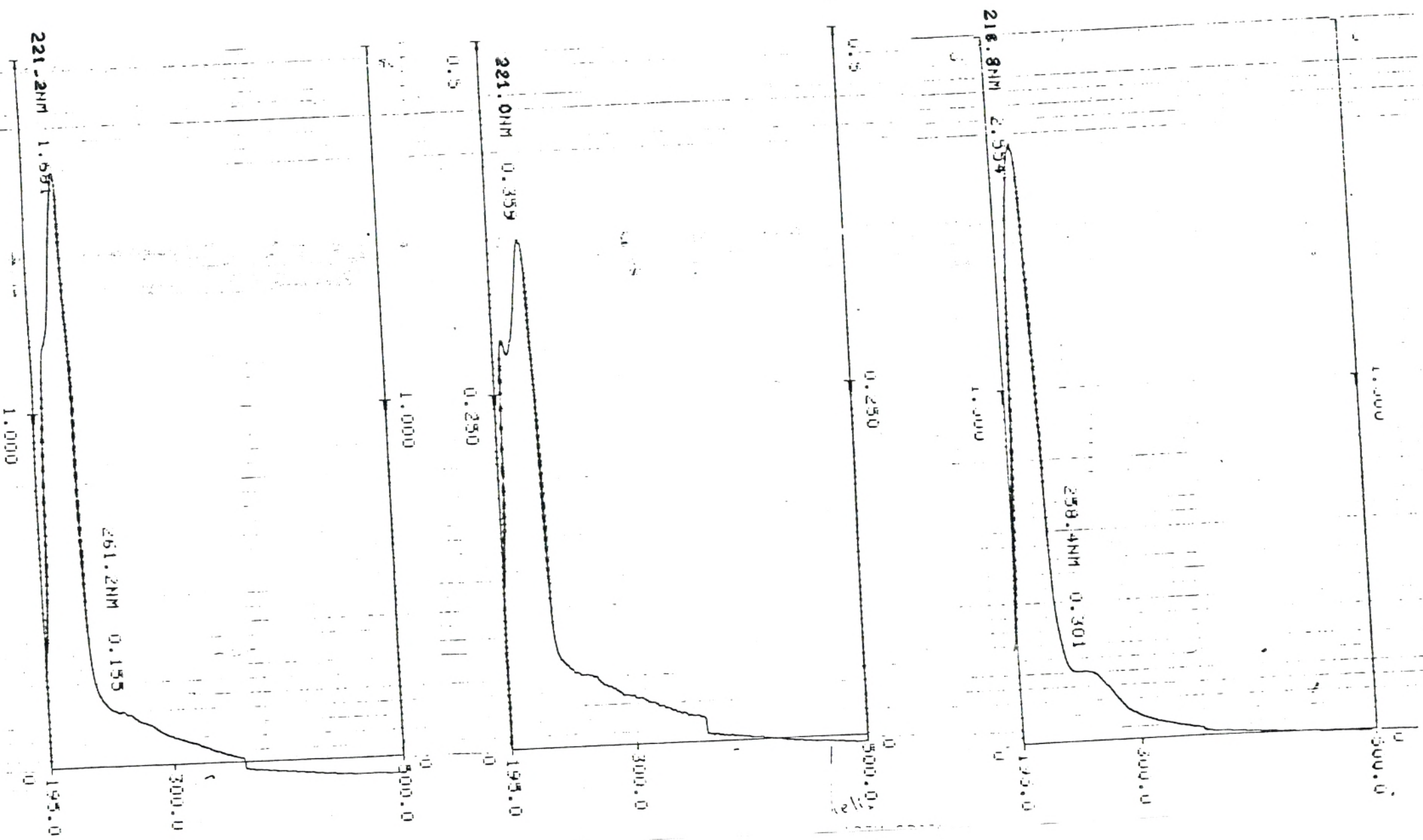


Figure n° 19  
Spectres U.V visible des fractions de l'extrait purifié C<sub>2</sub>

\* Le produit C<sub>3</sub>: Cet extrait correspond à la tâche de Rf = 0,79. Une première injection de 0,5ml de C<sub>3</sub> au gradient méthanol-eau: 30-50-80 et 100% de méthanol nous a permis de récolter les fractions à 30 et 80% (voir figure n° 20).

Nous avons testé ces différentes fractions par antibiographie en utilisant le même germe-cible.

Les résultats de l'antibiographie montrent l'élution de deux fractions, l'une éluee à 30% et l'autre à 80%. Elles sont actives sur *Bacillus subtilis* avec les zones d'inhibition respectives: 13mm et 10mm.





Figure n° 20

Profil d'élution du produit C<sub>3</sub> (zone de rf = 0,73)

\* Conditions : - solvant d'injection : méthanol 100%

- volume d'injection : 0,5 ml

- solvant d'élution : mélange méthanol-eau 30%-50%-80%-100%

- débit : 2ml/mn

- détection : U.V à 220 nm

- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>

\* Les zones hachurées correspondent aux zones actives.

Après affinement du gradient à 25-50-75 et 100% méthanol-eau, nous obtenons le spectre suivant représenté dans la figure n° 21.

Les fractions actives sont éluées à 25% et 75% méthanol-eau.

Après la purification de l'extrait C<sub>3</sub> par HPLC, nous avons réalisé les spectres U.V visible des fractions actives récoltées.

Les résultats de cette étude sont représentés par la figure n° 22.

Il existe trois fractions: C<sub>3</sub>25, C<sub>3</sub>175 et C<sub>3</sub>275.



Figure n° 2 1

Profil d'élution du produit C<sub>3</sub> après affinement du gradient (HPLC finale)

- éluant : mélange méthanol-eau 25%-50%-75%-100%
- débit : 2ml/mn
- détection : U.V à 220 nm
- colonne : Delta Pak C<sub>18</sub>

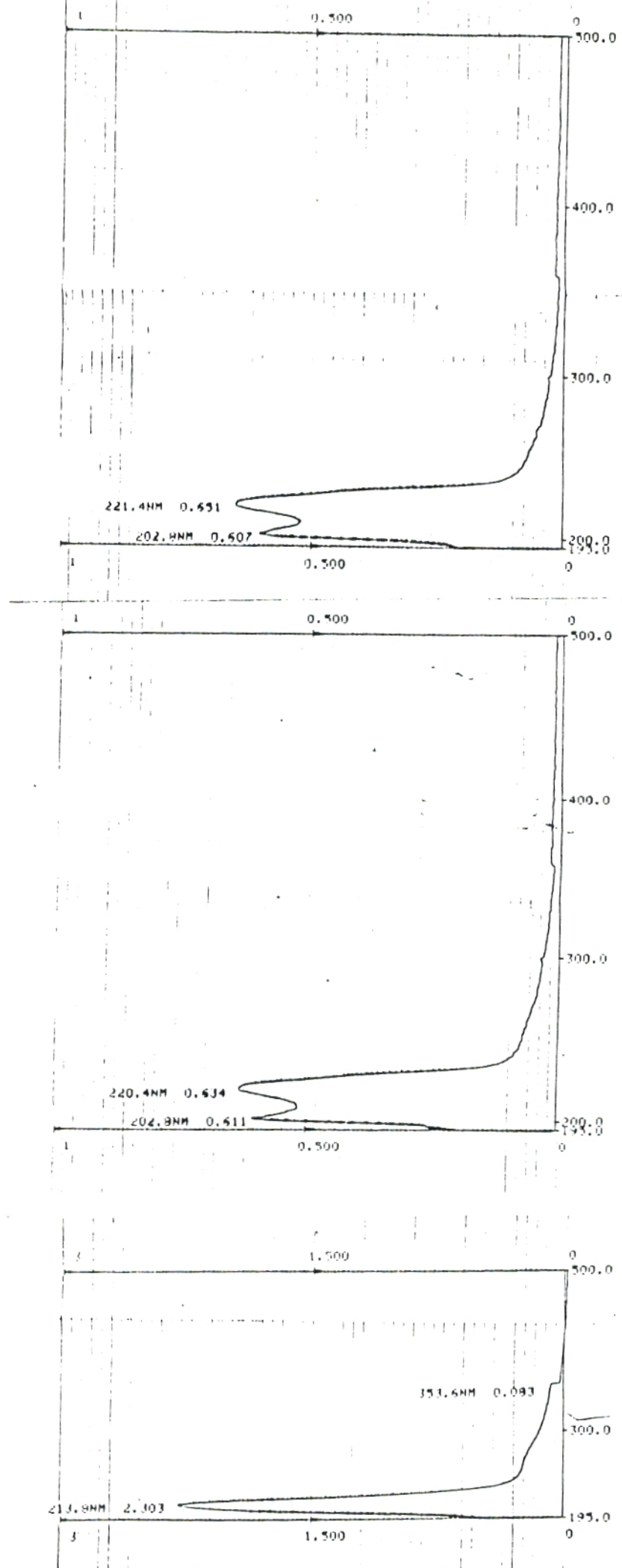


Figure n° 22  
Spectres U.V visible de l'extrait purifié C3

### 3.3.4 Conclusion

La chromatographie liquide à haute performance nous a permis de purifier les produits synthétisés par les deux souches A125M et C25SM, La première produisant deux produits: B25 et B'100, et la seconde sept produits, soit: C<sub>1</sub>25, C<sub>1</sub>75, C<sub>1</sub>'100, C<sub>2</sub>25, C<sub>2</sub>75, C<sub>3</sub>25, C<sub>3</sub>'75.

Nous rappelons que les produits purifiés de la souche A125M sont actifs sur *Candida albicans* et les produits de la seconde souche C25SM sont actifs sur *Bacillus subtilis*. Ces résultats concordent avec ceux obtenus précédemment (voir chapitre II).

## 3.4 Etudes spectroscopiques des antibiotiques purifiés

### 3.4.1 Infrarouge

Compte tenu des petites quantités récoltées au cours de la purification par HPLC, nous avons choisi les fractions contenant le plus de produit, en l'occurrence: C<sub>1</sub>25, C<sub>3</sub>25 (Souche C25SM) pour réaliser le spectre IR de chacune de ces fractions.

Nous avons préparé les échantillons sous forme de pastilles à 1% de bromure de potassium (Kbr).

Les spectres obtenus sont donnés dans les figures n° 23 et n° 24.

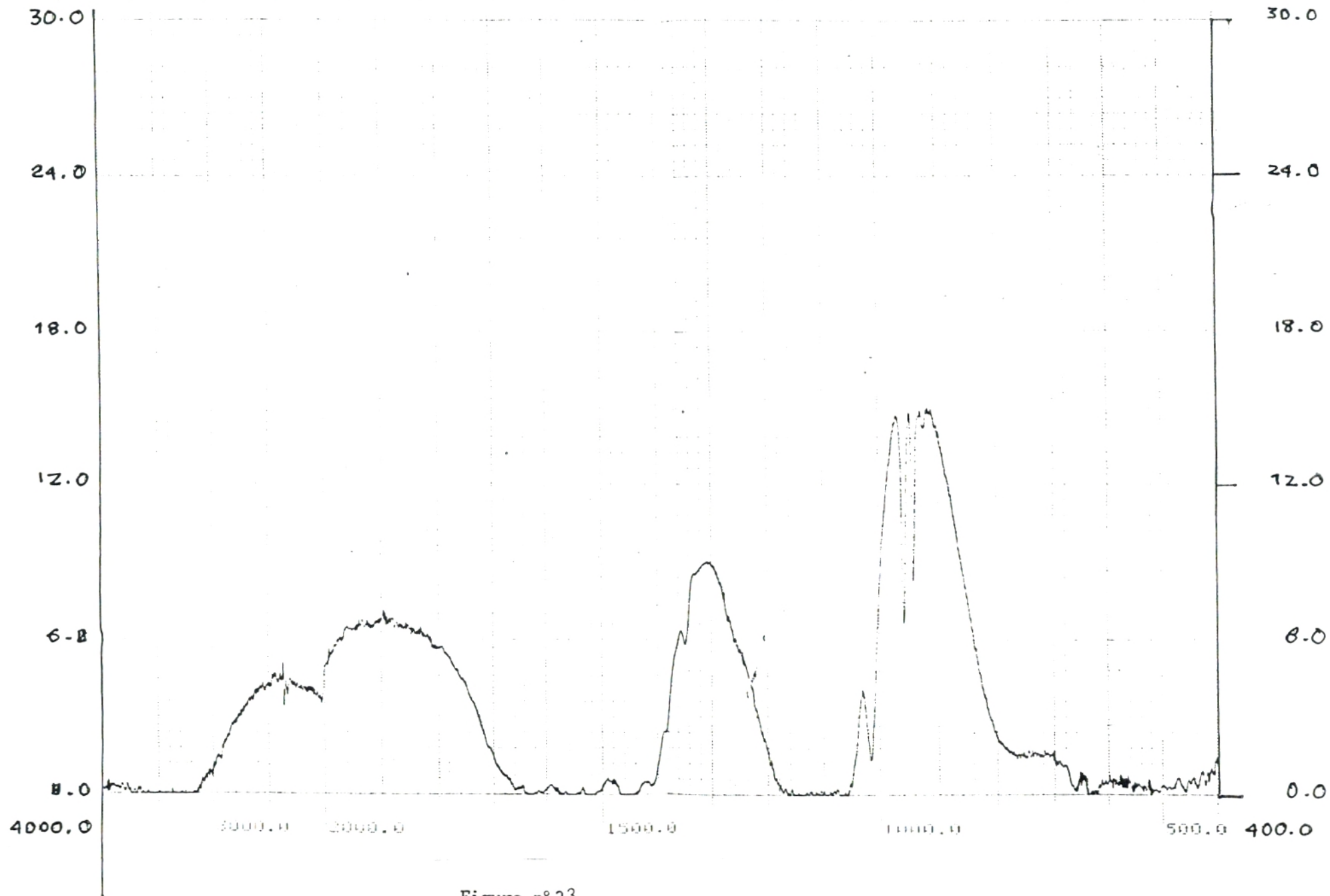


Figure n° 23

Spectre infra-rouge de l'extrait purifié C<sub>3</sub>:C<sub>25</sub>

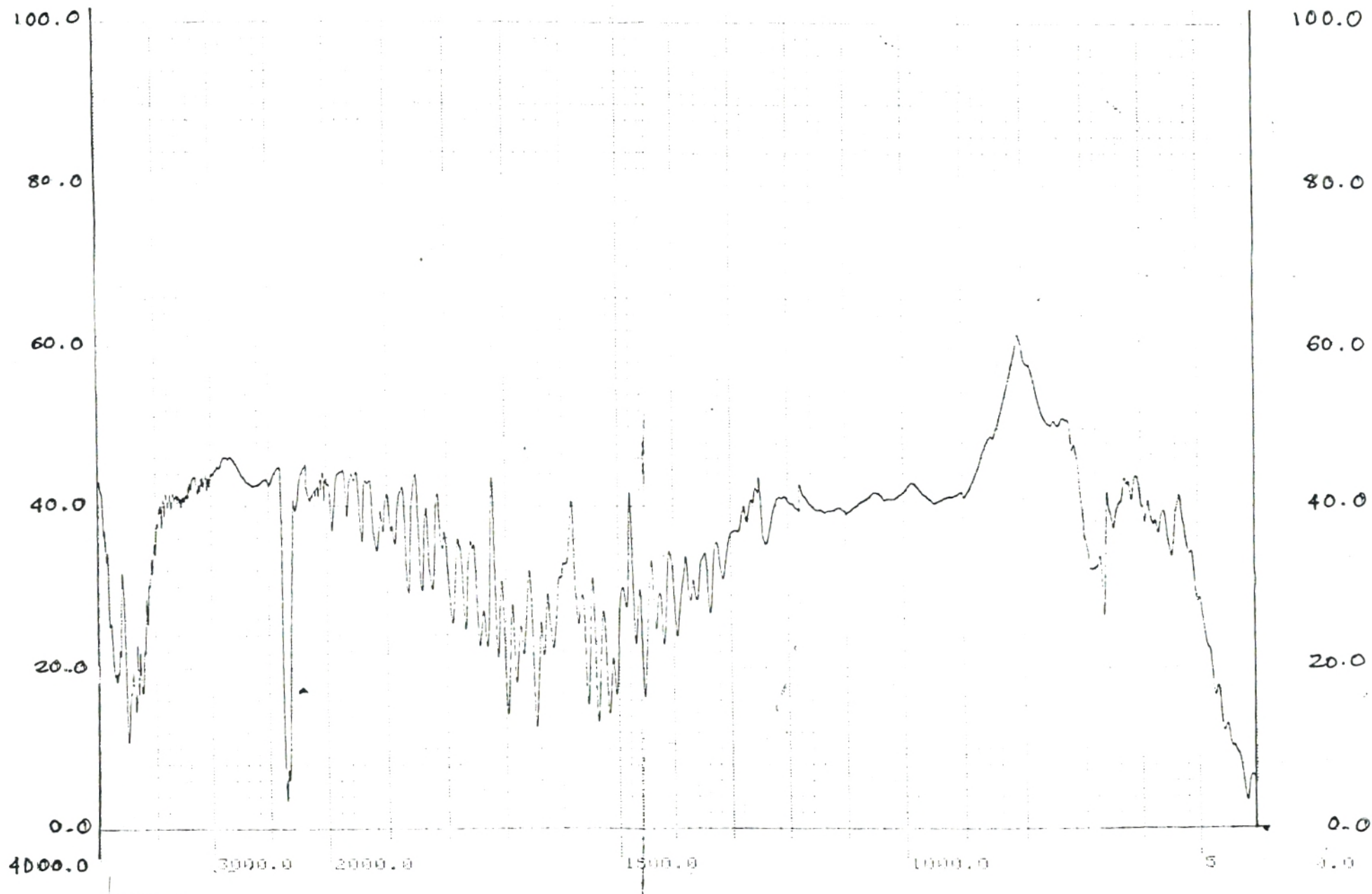


Figure n° 24

Spectre infra-rouge de l'extrait purifié C<sub>1</sub>:C<sub>125</sub>

### 3.4.2 Purification ultime du produit C<sub>125</sub> en vue d'un spectre de masse

Nous avons utilisé, contrairement aux fois précédentes, un gradient méthanol-eau continu avec la nouvelle HPLC.

Le gradient méthanol-eau choisi: 10 → 25% pendant 25 minutes.

Au bout de la première minute, il y a élution des fractions du produit C<sub>125</sub>, comme le montre la figure n° 25.



UV-VIS SPECTRA 100 nm

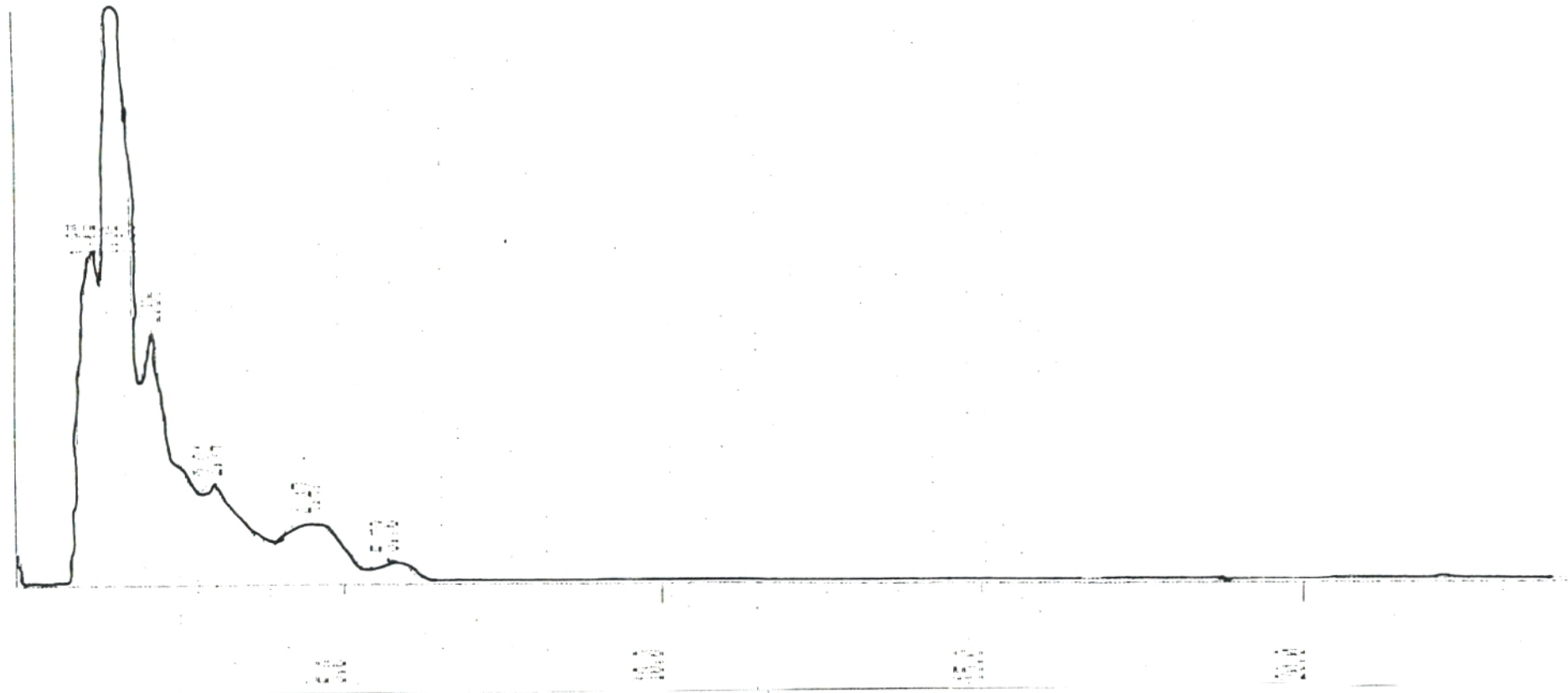


Figure n° 2 5

Profil d'élution de la fraction C<sub>1</sub> 25 de l'extrait C<sub>1</sub>

Gradient méthanol-eau croissant : 10 - 25%

Zones hachurées : zones actives

Nous avons récolté les deux premiers pics et nous les avons testé par antibiographie afin de vérifier l'activité, qui se révéla positive. La figure n°26 représente le spectre U.V visible de la fraction C<sub>1</sub>25 purifiée et nous notons l'absorbance à 255nm. La figure n°27 montre son absorption aux différentes ondes. La fraction correspondant aux deux pics réunis a été réinjectée une deuxième fois: le gradient méthanol-eau choisi:

0% méthanol → 10% méthanol pendant 20 minutes

Nous constatons qu'au bout de la deuxième minute, il y a élution de produit quasiment à 100% d'eau. Ce qui montre la solubilité de cet antibiotique dans l'eau (figure n°28). Cette remarque a été faite sur l'extrait brut de la souche C25SM.

Sur le spectre obtenu, nous avons numéroté les pics: 1, 2 et 3 correspondant chacun à une fraction de l'antibiotique et à chaque fraction correspond un spectre U.V visible (figures n°29, n°30 et n°31).

Nous notons une absorbance presque identique 250-260nm pour les trois fractions, suggérant leur appartenance à un même antibiotique ou à trois isomères. Toute cette analyse spectrale montre que nous avons obtenu un degré de pureté suffisant pour réaliser le spectre de masse. Cette tentative a malheureusement échoué; une seconde a été impossible à réaliser pour des raisons de quantité de produit.

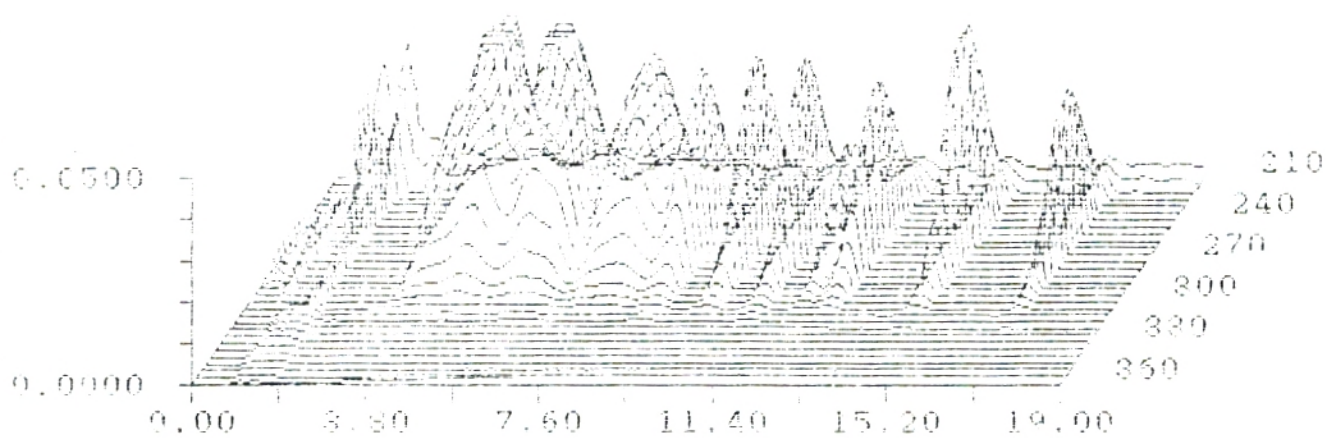


Figure n° 27

Spectre U.V visible de la fraction C<sub>1</sub> 25 à différentes ondes

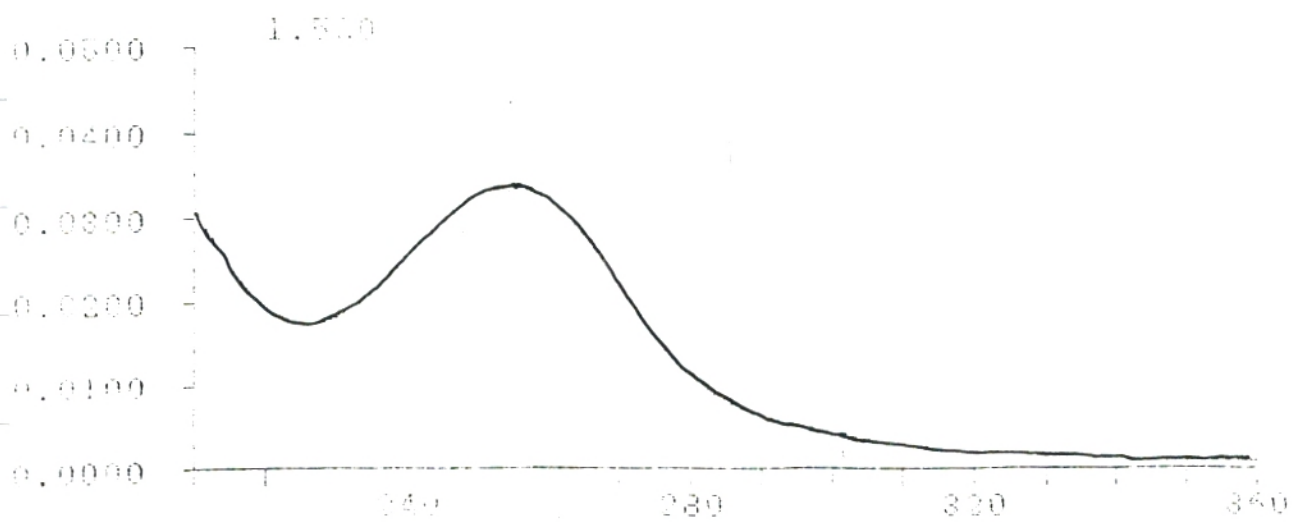


Figure n° 25

Spectre U.V visible de la fraction C<sub>1</sub> 25

X

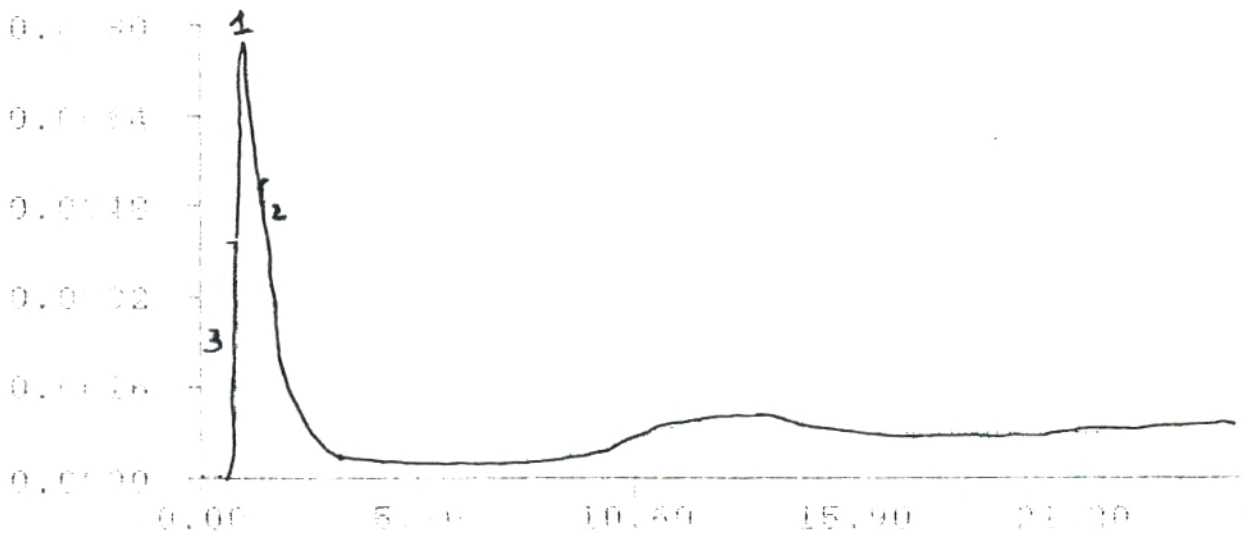


Figure n° 28  
Profil d'éluion de la fraction C<sub>1</sub> 25 purifiée  
Gradient méthanol-eau croissant: 0-10%

X

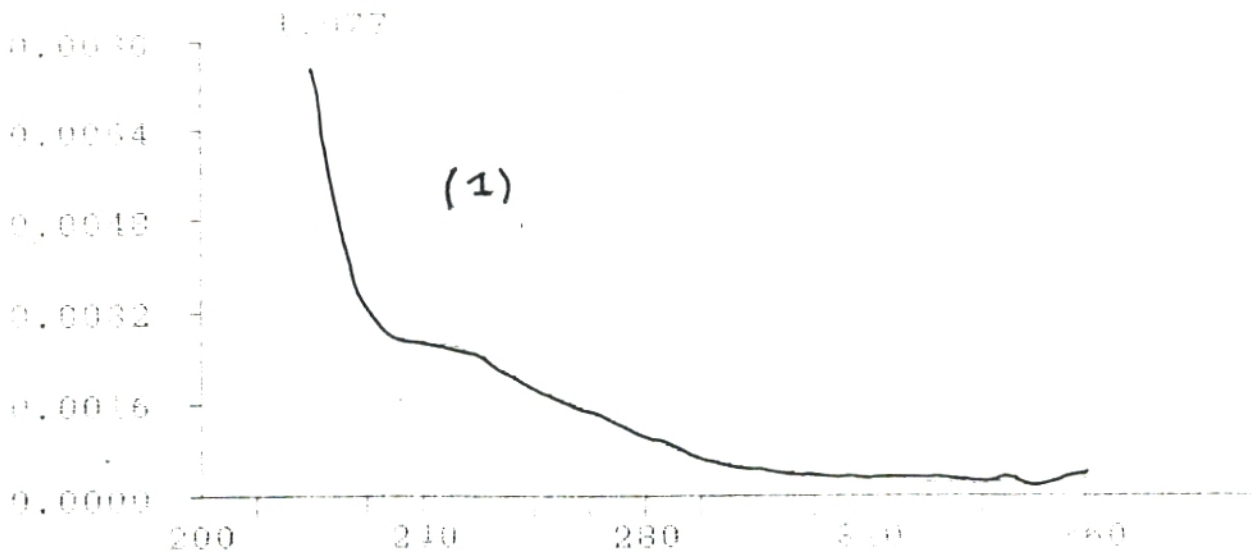


Figure n° 29  
U.V visible de la fraction (1)

Figure n° 31  
U.V visible de la fraction (3)

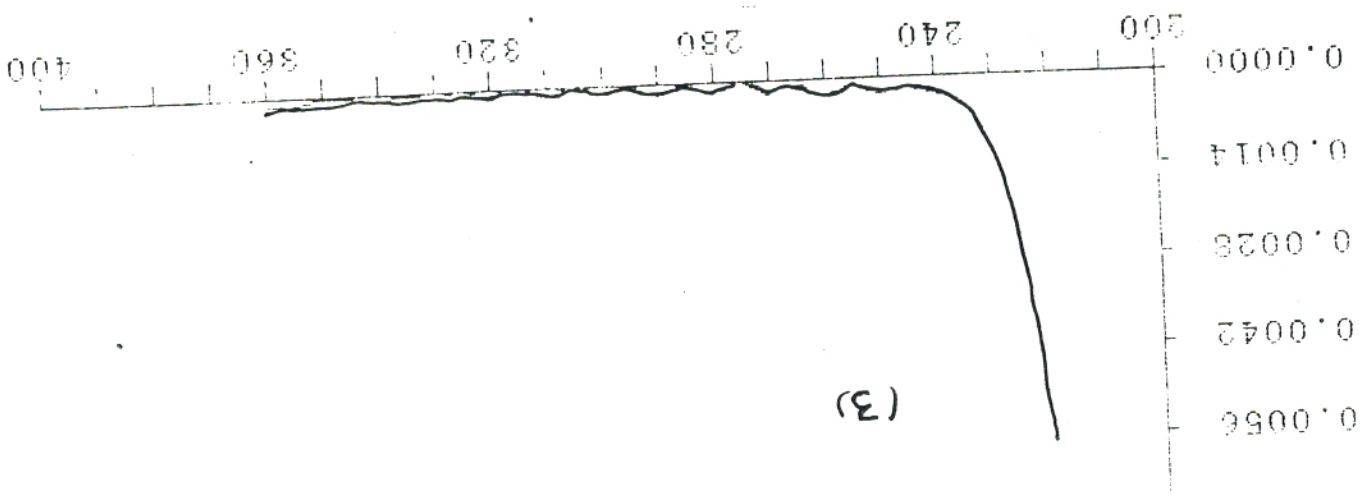
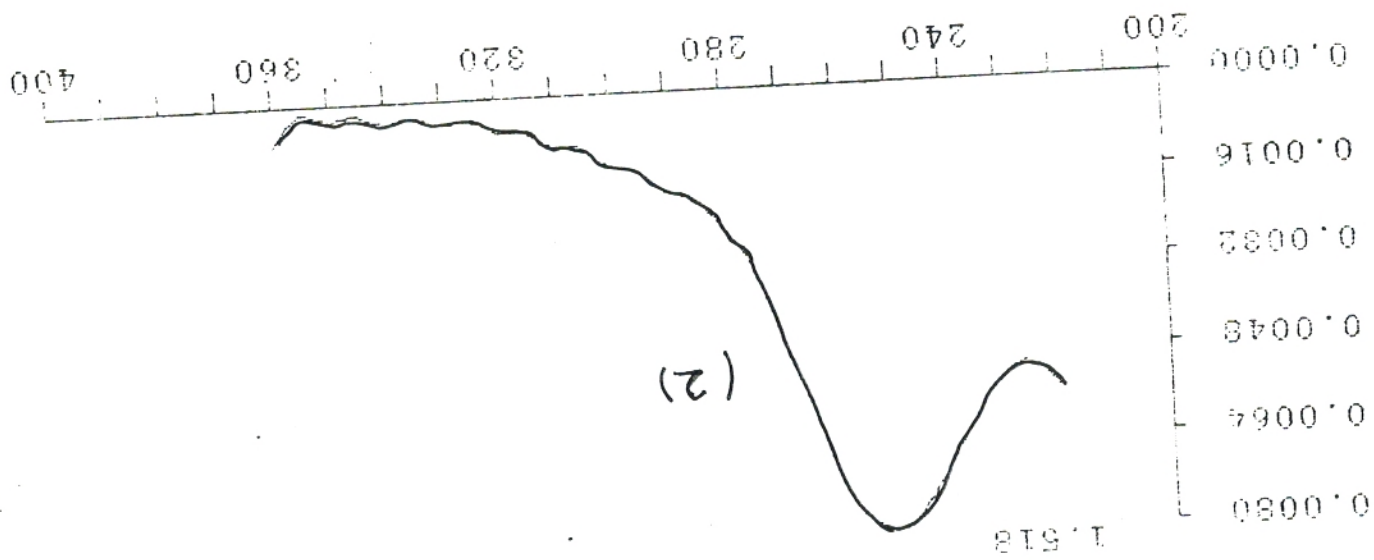


Figure n° 30  
U.V visible de la fraction (2)



### 3.4.3 Interprétation des résultats des études spectrophotométriques

\* l'U.V visible

- Le produit B<sub>2</sub>:

L'examen des spectres d'absorption obtenus nous a permis de faire les remarques suivantes:

La souche A125M a produit un antifongique de type non polyénique; notons l'absence des trois pics caractéristiques des polyènes (Tableau n° 25).

De plus, ces spectres montrent que les produits ne sont pas colorés.

Nous remarquons également qu'ils sont insaturés.

Nous rappelons que notre composé antifongique est inactif sur *Pythium irregulare*, champignon connu comme étant dépourvu de stérols membranaires, insensible aux polyènes, donc sensible aux antifongiques non polyéniques. Ceci nous mène à dire que l'utilisation de souche cible comme *Pythium irregulare* ne nous permet pas d'affirmer que l'antifongique en question est de type polyénique ou non.

L'inverse a été découvert pour certains polyènes comme la fariéfungine (NAIR et *al*, 1989) et l'enocyloxine (WATANABE et *al*, 1991) et l'antifongique AH17 (HACENE et LEFEBVRE, 1995a) qui présentent en plus de l'activité antifongique, une activité dirigée contre des bactéries dépourvues de stérols membranaires.

Néanmoins, ce type de germe-cible constitue un début d'indication qui doit être confirmée plus tard par l'étude spectrophotométrique.

Tableau n° 25 : Données sur l'absorption dans l'U.V visible des  
macrolides polyènes (DINYA et STZARI, 1987)

Groupe des Polyènes	Longueur d'ondes ( $\pm$ 2nm)			Exemples
	1er pic	2ème pic	3ème pic	
Triènes	262	272	283	Trièneine
Tétraènes	291	304	318	Nystatine
Pentaènes	317	330	350	Eurocidine
Hexaènes	340	358	380	Candihexine
Heptaènes	361	382	405	Amphotéricine A

- Les produits C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>:

\* C<sub>1</sub>:

Les 4 fractions présentent une absorbance quasiment identique de l'ordre de 203nm suggérant qu'il s'agit du même antibiotique fractionné au cours de la purification par HPLC, ou des isomères de ce même antibiotique.

Quant à la 5ème fraction (C<sub>1</sub>25), elle présente une absorbance à 220nm. Ces spectres montrent que les produits sont insaturés et non colorés.

\* C<sub>2</sub>:

Les deux premiers spectres (voir figure n°20) sont identiques; l'absorbance est égale à 221nm, ce qui est prévisible puisqu'il s'agit de deux fractions sorties à 75% de méthanol, c'est certainement des molécules apparentées pouvant correspondre aux molécules dérivées contenues dans l'extrait injecté.

Quant à la dernière fraction, nous notons une absorbance à 216nm.

Ici, également, nous notons qu'il s'agit de composés insaturés.

\* C<sub>3</sub>:

Les deux fractions sorties à 75% présentent le même spectre d'absorption (figure n°23), environ 221nm et 202nm tandis que la fraction C<sub>3</sub>25 absorbe à 213nm.

Infra-Rouge:

\* C<sub>1</sub>25: (Figure n°24)

Nous remarquons un pic caractéristique correspondant à une bande d'absorption de 2440cm<sup>-1</sup>, soit P-H, un composé phosphorique et un autre pic apparaissant à 680cm<sup>-1</sup>, soit P=S.



\* C<sub>3</sub>25: (Figure n° 25)

L'allure du spectre ressemble beaucoup à celle d'un amino-glycoside, ce qui confirme les résultats obtenus au cours des révélations chimiques. Les pics ne sont pas bien visibles, c'est probablement dû à un excès de produit.

### 3.5 Discussion générale

Les objectifs d'un programme d'isolement peuvent être la recherche d'un nouveau type de microorganisme, avec l'espoir qu'ils produisent de nouveaux métabolites secondaires.

Dans le cas des actinomycétales, les streptomycètes ont été intensément exploités. Il faut continuer à isoler les espèces de ce genre, mais en essayant de trouver des espèces rares, inhabituelles.

Notre étude se place exactement dans cet axe de recherches. Le choix du lac d'EL-Goléa l'a été à juste titre (milieu extrême).

Les résultats des dénombrements montrent une flore d'Actinomycètes aquatiques plus représentative à 0%, 3% et 10% de sel, et absente à 20% et 25%; nous avons isolé par ailleurs des souches extrêmement particulières que nous avons par la suite rattaché au groupe de bactéries métalliques (PRINGSHEIM, 1948).

Les actinomycètes "halophiles" ou, du moins, pouvant croître à certaines concentrations de sel, sont peu exploités. Néanmoins, certaines équipes comme PISANO et *al* (1987) ont isolé 165 souches d'Actinomycètes des sédiments de la rivière Hudson en utilisant des méthodes sélectives: des prétraitements au phénol; 22 isolats présentaient une activité antifongique. Il s'est avéré que ces substances sont polyéniques; quant à l'identification des

Actinomycètes, tous les isolats sont des streptomycètes à une exception près.

Actuellement, les bactéries halophiles ou halotolérantes présentent beaucoup d'intérêt, leur comportement dans des exosystèmes salés est étudié car ce type de niche écologique a la particularité d'héberger une communauté microbienne très pauvre mais adaptée.

Selon GALINSKI et TRUPER (1994), les bactéries développent deux mécanismes d'osmoadaptation: le type Kcl et le type des solutés compatibles.

Les 94 Actinomycètes que nous avons isolé appartiennent à trois genres différents:

*Streptomyces, Micromonospora, Thermoactinomyces.*

Ces résultats montrent une diversité très faible au sein de cette flore.

VALERA et *al* (1985) ont beaucoup travaillé sur les populations microbiennes des environnements salés, définissent ce genre de milieu comme niche où peu de groupes taxonomiques sont retrouvés et les espèces sont peu diversifiées.

Nos résultats vont dans ce sens.

De plus, ces trois genres sont cités dans la littérature concernant les Actinomycètes des milieux aquatiques (marins ou lacustres).

Les genres *Actinoplanes, Rhodococcus* sont également cités (LARPENT et SANGLIER, 1989), mais non retrouvés au cours de notre étude.

Le criblage de souches nous a permis de sélectionner deux souches très intéressantes par leurs activités antibiotiques et très particulières du point de vue taxonomique.

Ce sont des souches isolées à 20% et 25% de sel mais pouvant croître à 0% de sel et ont une morphologie très particulière sous forme de microcolonies.

Dans un premier temps, nous pensions qu'il s'agissait d'Actinomycètes très rares.

Nous avons observé leur croissance sur les différents milieux ISP, aucune différence morphologique n'a été notée. Elles poussent en tête d'épingle, nous avons émis l'hypothèse d'une microaérophilie.

Nous avons essayé la galerie classique des bactéries; aucun résultat, le type respiratoire V.F n'a pas fonctionné.

Au cours de nos recherches dans les BERGEY'S (1974, 1989, 1994), nous avons constaté que nos deux isolats ont beaucoup de points communs avec un groupe de bactéries connu sous le nom d'"Iron Bactéria" (PRINGSHEIM, 1948).

Les genres suspectés sont: *Metallogenium*, *Gallionella*, *Caulobacter*, *Ochrobium*.

Dans la 8ème édition du Bergey (1974), les germes *Gallionella* et *Metallogenium* appartiennent au groupe: "Budding and/or Appendaged Bacteria".

ZAVARIN et HIRSH (1974) décrivent le genre *Gallionella* comme suit: les cellules sont en forme de rein ou rondes et se terminent par de longues "tiges" recouvertes d'hydroxide de métaux, microaérophile se développant à pH = 6 à 7.

La position taxonomique de ce genre est incertaine, il peut être assimilé au genre *Metallogenium*.

Le genre *Gallionella* selon EHRENBERG (1838) et BALASHOVA (1967) est largement distribué dans les eaux de drainage.

Ces mêmes auteurs donnent une description du genre *Metallogenium*: les cellules sont coccoïdes, la germination se fait par bourgeonnement et il y a formation de corpuscules: "elementary bodies", ces derniers forment par la suite des filaments.

La microscopie électronique des deux souches montre d'une manière claire la présence de filaments ainsi que des cellules.

De plus, la croissance des cultures pures en milieu artificiel est très lente, ce qui est similaire au type de croissance de nos deux souches. Ce genre est également retrouvé dans les eaux fraîches, eaux lacustres.

Néanmoins, la taxonomie de ces organismes est incertaine selon DUBININA (1969, 1970). BALASHOVA (1969) trouve des similarités entre *Metallogenium* et les mycoplasmes *Caulococcus* et *Kusnezovia*.

WALSH et MITCHELL (1972) ont obtenu une culture pure de *Metallogenium*; la bactérie est filamenteuse, similaire à certaines formes de *Gallionella* et *Metallogenium*.

La différenciation de ces deux genres a été faite sur la base de la morphologie et son exigence de croissance et, finalement, la présence de composés ferriques.

Dans la dernière édition du Bergey (1994) dans le groupe 12, sous-groupe 2 (Iron and manganese oxidising and/or depositing Bacteria), nous retrouvons le genre *Gallionella*, le genre *Ochrobium* (Famille: *Siderocapsaceae*), et enfin le genre *Metallogenium* avec la description de deux genres lui ressemblant: *Caulococcus* et *Kusnezovia*.

Toutes ces références montrent l'extrême difficulté de départager ces genres. C'est pour cela, nous ne pouvons affirmer d'une manière absolue que les deux souches A125M et C25SM appartiennent au genre *Metallogenium* mais elles s'y rapprochent fortement.

L'identification de ces deux souches a été faite sur la base de critères morphologiques, d'où la nécessité de la microscopie électronique qui nous a permis de trancher sur l'appartenance de ces deux souches au genre *Metallogenium*.

La dernière partie de notre étude, concernant la production d'antibiotiques, fût également assez difficile du fait de la croissance très lente de ces deux souches.

Pour la souche A125M:

Nous avons obtenu un antifongique de nature non polyénique. Les spectres U.V visibles le confirment (figure n° 15). Ceci constitue un excellent résultat puisque c'est le but recherché mais, du fait des petites quantités récoltées au cours de la purification par HPLC, l'infra-rouge n'a pas été réalisé, ce qui est dommage car il aurait pu nous renseigner sur la structure de cet antifongique.

La souche C25SM a été finalement la plus exploitée; les spectres U.V visibles (figures n° 17, n° 20 et n° 23) montrent qu'il s'agit de composés insaturés et les spectres infra-rouge des deux fractions actives C<sub>1</sub>25 et C<sub>3</sub>25 sont très intéressants:

C<sub>1</sub>25: nous détectons deux pics caractéristiques des composés métalliques P=S et P-H.

Quant à la C<sub>3</sub>25, il s'agit probablement d'un aminoside; ce genre de spectre est assez caractéristique. De plus, il faut bien préciser que le produit est soluble dans l'eau, résultat retrouvé au cours de l'étude des caractéristiques de l'extrait brut produit par la souche C25SM et confirmé par la suite au cours de la purification par HPLC.

Les révélations chimiques concordent parfaitement aux résultats obtenus dans les études spectroscopiques.

Enfin, le spectre de masse n'a pas donné de résultats effectifs, bien que le produit soit très pur.

En somme, cette étude nous a permis d'aborder plusieurs volets, les actinomycètes, les bactéries métalliques et enfin la production proprement dite.

Nos deux souches, du point de vue production industrielle, ont un handicap majeur: temps d'incubation très long (FLORENT, 1983); toutefois, les produits sont très probablement nouveaux.

## CONCLUSION GENERALE

L'un des problèmes posés par le développement des champignons microscopiques concerne le domaine médical. Devant l'augmentation des mycoses systémiques, provoquées par des champignons opportunistes, et le nombre restreint de principes actifs utilisables en thérapeutique, il apparaît indispensable de poursuivre les programmes de recherche visant à découvrir des composés plus actifs et moins toxiques. Aucune molécule, à l'heure actuelle, ne peut être considérée comme l'antifongique idéal. Parmi les substances obtenues par voie microbiologique, ce sont les polyènes, avec l'amphotéricine B pour chef de file, qui jouent le rôle le plus important. Mais bien que très actifs, leur maniement est dans certains cas rendu difficile et leur emploi se voit limité par la toxicité commune à ce groupe de composés. Parmi les antifongiques de structure non polyénique, seule la griséofulvine est prescrite, mais son spectre d'activité est limité aux champignons dermatophytes responsables de mycoses superficielles.

L'ensemble de ces considérations nous a conduit à élaborer un programme d'étude dont le but a été d'isoler une ou deux souches d'Actinomycètes rares ou souches particulières, produisant un antifongique de structure non polyénique.

Le lieu de nos prélèvements (le lac d'El-Goléa) a été choisi afin d'optimiser les chances de découverte de souches particulières et, pourquoi pas, de nouvelles biomolécules actives, comme cela a été le cas dans notre laboratoire.

Avant d'entreprendre cette recherche, une étude bibliographique nous a fait prendre conscience de l'importance de nos investigations concernant les Actinomycètes aquatiques vivant dans des écosystèmes salés (milieu marin, lacustres salés) car peu de travaux sont reportés à ce sujet.

Elle nous a permis également de souligner le rôle prépondérant des Actinomycètes, représentés essentiellement par le genre *Streptomyces*, en tant que producteurs de substances antimicrobiennes.

Enfin, les principales approches rencontrées dans la littérature, permettant de détecter de nouvelles activités microbiennes, ont été énumérées.

L'étude expérimentale, divisée en trois parties, a consisté tout d'abord à isoler, à partir d'échantillons d'eau et de boues, des souches d'Actinomycètes ou souches leur ressemblant, les identifier et sélectionner des souches productrices d'antibiotiques (antifongique ou antibactérien).

Ce travail de screening nous a conduit à retenir deux souches n'appartenant pas, finalement, au groupe des Actinomycètes mais à un groupe particulier de bactéries connu sous le nom de "bactéries métalliques".

Notre tâche a été d'identifier ces deux isolats en se basant uniquement sur des critères morphologiques. Nous les avons rattachés au genre *Metallogenium*. Dans la bibliographie, deux espèces sont citées: *Metallogenium personatum* et *Metallogenium symbioticum*. La souche A125M présente toutes les caractéristiques de la première espèce alors que la souche C25SM n'a aucune similitude avec la seconde sur un point capital: elle ne vit pas en symbiose avec les champignons. Ceci nous mène à penser qu'il s'agit probablement d'une nouvelle souche. C'est



un résultat très important qu'il faut par la suite confirmer par des études génétiques.

Nous avons pu isoler 135 souches dont 94 sont des actinomycètes vrais, rattachées à trois genres différents. Quant aux 41 souches restantes, nous n'avons pas pu les rattacher au groupe des Actinomycètes; elles appartiennent au groupe de bactéries métalliques.

L'activité antifongique et antibactérienne de toutes les souches isolées a été recherchée par une technique de diffusion sur gélose vis à vis de trois souches de bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*) et de deux souches de levures (*Candida albicans* et *Rhodotorulla mucilaginosa*) et de deux souches de champignons (*Fusarium oxysporum* et *Pythium irregulare*).

La levure *Candida* et le champignon *Pythium* s'avèrent peu ou pas sensibles à l'action des antifongiques de structure polyénique.

Il s'est avéré que les deux souches choisies A125M et C25SM, l'une produisant un antifongique et l'autre un antibactérien, appartiennent au groupe de bactéries particulières, les bactéries métalliques appartenant au genre *Metallogenium*.

La souche A125M élabore un produit inhibant d'une manière spécifique la levure *Candida albicans* et la souche C25SM, un produit inhibant la croissance des bactéries Gram+ et Gram-.

L'activité microbienne n'a été retrouvée que dans les surnageants des deux souches.

Après extraction à l'acétate d'éthyle des surnageants des deux souches et évaporation de cette phase organique, les extraits sont repris dans du méthanol.

Dans le premier cas, une seule activité est détectée (B<sub>2</sub>), dans le second, trois zones actives (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>) sont séparées par CCM, toutes

révélées par bioautographie. Des révélations chimiques ont été menées en parallèle, révélant la présence de protéines et de glucides, notamment dans les produits sécrétés par la souche C25SM.

La purification des molécules actives est réalisée par HPLC en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Les fractions actives ont été détectées à 25%, 75% et 100% de méthanol.

Leur spectre U.V visible a été déterminé.

Pour les fractions du produit B<sub>2</sub>, aucune n'est polyénique.

Le spectre infra-rouge a été fait uniquement pour deux fractions actives issues des deux zones C<sub>1</sub> et C<sub>3</sub> (souche C25SM).

L'une de ces fractions (C<sub>125</sub>) a été purifiée au maximum en choisissant un gradient continu méthanol-eau, afin de réaliser le spectre de masse. Cette perspective a échoué.

La purification des molécules actives doit être plus approfondie et devrait permettre d'évaluer les potentialités d'un développement éventuel de ces souches; néanmoins, les résultats de nos études spectroscopiques sont intéressants, le produit C<sub>125</sub> contient un groupement très particulier P=H, quant au produit C<sub>325</sub>, il appartiendrait à la famille des amino-glycosides.

Leur identification doit être confirmée par des techniques de Biologie moléculaire plus élaborées; elles permettront de trancher sur la place taxonomique de ces bactéries très particulières.

Par conséquent, ce travail ouvre deux perspectives; ce n'est qu'après avoir satisfait à un certain nombre de critères dans les deux sens (identification précise des souches au niveau de l'espèce, caractérisation finale des molécules actives) que l'utilisation éventuelle de ces molécules pourra être envisagée en thérapeutique ou

en d'autres domaines si toutefois elles présentent un avantage réel par rapport aux composés déjà commercialisés.

Une étude génétique ultérieure, si elle confirme notre identification qui constitue une modeste approche, valorisera ce travail et mettra en relief l'originalité et la nouveauté de cette étude.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

ALDERSON G., RITCHIE D.A., CAPPELLANO C., COOL R.H., IRANOVA N.M., HUDDLESTON A.S., FLAXMAN C.S., KRISTUFECK and LOUMES A., (1993) -Physiology and genetics of antibiotic production and resistance- Res. Microbiol., **144**, 665-672

AMIR H. et AMIR A., (1989) - Influence de la désinfection et du type de sol sur l'antagonisme d'un actinomycète vis à vis d'une souche de *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*- Rev.Ecol.Biol.Sol., **26**, 57-74

ASZALOS A., (1987) - Modern analysis of antibiotics- Vol.27, Marcel Dekker, Inc., New York, 539p.

BALASHOVA., (1967, 1969) in : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"., (1974)- 8 th Edition. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1268p.

BECKER B., LECHEVALIER M.P., GORDON R.E. and LECHEVALIER H.A., (1964) -Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates- Appl.Microbiol., **12**, 421-423

BERDY J., (1974) -Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure- Adv.App.Microbiol. **18**, 309-406

BERDY J., (1980) -Recent advances in prospects of antibiotic research- Process Biochemistry, 28-35

BERDY J., (1984) -New ways to obtain new antibiotics- Chin.J.antibio. **9**, 348-360.

BERDY J., (1985) -Screening, classification and identification of microbiol products. in:"Discovery and isolation of microbial products" (Verral M.S., Coord.) pp 9-31 Ellis Hovwood Pub. Chichester.

- BERDY J., ASZALOS A., BOSTLAN M. and McNITT K., (1980/81)  
Hand book antibiotic compounds, Vol I à X, CRC Press. Boca Raton.
- BERDY J., ASZALOS A. and McNITT K., (1987)  
K.L. (ed.) CRC Handbook of antibiotics compounds, Vol. XIII Microbial Metabolites, Parts 1, 2, 3. Boca Raton: CRC press.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, (1974), 8th Edition.  
Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1268p.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1989)., Vol 4, Williams S.T.,  
SHARPE M.E. and HOLT J.G. (Eds.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2648p.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, (1994), 9th Edition.  
HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T. and WILLIAMS S.T. (Eds) Williams and Wilkins, Baltimore
- BETINA V., (1973) -Bioautography in paper and thin layer  
chromatography and its scope in the antibiotic field- J.Chromat., 78, 41-51.
- BETINA V., (1983) -The chemistry and biology of antibiotics- Nanta  
W.T. and Rekker R.F. (Eds). Elsevier. Amsterdam, 493-526.
- BRETON A., THEILLEUX J., SANGLIER J.J. and VOBIS G., (1989)  
-Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie- in:  
"Biotechnologie des antibiotiques" LARPENT J.P. et SANGLIER J.J. (Eds). Paris,  
Masson, pp 33-70.
- BOUBETRA D., (1997)-Contribution à l'étude de la flore alguale des  
milieux extrêmes- Thèse de Magister en cours.
- BOUDJELAL F., (1997)-Contribution à l'étude de la flore bactérienne  
des milieux extrêmes- Thèse de Magister en cours.
- BOUTAIBA S., (1997)-Contribution à l'étude de la flore fongique du lac  
d'El Goléa: écologie, taxonomie et production de métabolites- Thèse de  
Magister, option Biologie Moléculaire et Cellulaire, Inst. Sc.Nat.Tlemcen.

- CHAIN et FLOREY., (1940) in: "Production industrielle d'un antibiotique majeur" FLOREY J., (1983). Rev. Biofutur. Oct 83.
- CRANDALL L.W. and HAMILL R.L., (1986) -Antibiotics produced by *Streptomyces*: Major Structural classes-
- CROSS T., (1981) -Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence growth and role of actinomycetes in aquatic habitats- J.Appl.Bacteriol., 50, 397-423.
- DEMAIN A.L. et SALOMON M.A., (1985) -Biology of industrial microorganisms- 573 pp. Benjamin Cummings Publishing Company, London.
- DESHAYES C., FALCONER C., MAZIERES N., SADDLER G., SANGLIER J.J. et SIRE B., (1984) -Sélection des souches productrices et caractérisation des molécules actives- in: "Biotechnologie des antibiotiques" LARPENT J.P. et SANGLIER J.J. (Eds). Paris, Masson, pp 71-138.
- DINYA Z.M and STZARI F.J., 1987 -Ultraviolet and light absorption spectrometry- in:"Modern analysis of antibiotics" (Aszalos, A., Ed.) New York: Marcel Dekker Co, p 19-96.
- DOMMERGUES Y. et MANGENOT F., (1970) -Ecologie microbienne du sol- Masson et Cie, Paris.
- DUBININA G., (1967) -le genre *Gallionella*- in: "BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY", (1974) Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1268p.
- DUBININA G., (1969) -le genre *Metallogenium*- in: "BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY", (1974) Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1268p.
- DUBININA G. and ZHDANOV A.V., (1975) -Recognition of the iron bacteria "*siderocapsa*" as *Arthrobacters* and description of *Arthrobacter siderocapsulalus sp.nov*- Int.Journal of Syst. Bacteriol. Vol 25, 4, 340-350.
- EHRENBERG C.G., (1838) in: "Iron Bacteria" PRINGSHEIM E.G., (1948). Botany School, University of Cambridge, p 200-239.

- FLECK W.F., (1974) -development of microbiological screening methods for detection of new antibiotics-
- FLEMING A., (1929) in: "the chemistry and biology of antibiotics"  
 BETINA V., (1983) Nauta W.T. and Rekker R.F. (Eds). Amsterdam Elsevier
- FLORENT J., (1983) -Production industrielle d'un antibiotique majeur-  
 Rev.Biofutur.Oct 83
- FOWLER V.J., LUDWING W. and STACKEBRANDT E., (1985) -Ribosomal ribonucleic acid cataloging in bacterial systematics: the phylogeny of *Actinomadura*- in: "chemical methods in bacterial systematics"  
 GOODFELLOW M. and MIMMIKIN D.E., (Eds.) pp 17-40 Ac.Press., London.
- GALINSKI E.A and TRUPER H.G., (1994) -Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems- FEMS Microbiology Reviews 15, 95-108.
- GOCHNAUER M.B., LEPPARD G.G., KOMAKATAI P., KATES M., NOVITSKI T. and KUSHNER D.J., (1975) -Isolation and characterisation of *Actinopolyspora halophila* genet sp.nov., an extremely halophilic *Actinomyces*  
 Can.J.Microbial.21,1500-1511.
- GOODFELLOW M. and WILLIAMS S.T., (1983) -Ecology of actinomycetes-  
 Ann.Rev.Microbial., 37, 189-216.
- GOODFELLOW M. and CROSS T., (1984) -Classification- in: "the biology of the actinomycetes" GOODFELLOW M., MORDARSKI M. and WILLIAMS S.T.(Eds.), Academic Press, London.
- GOODFELLOW M. and HAYNES J.A., (1984) in: "Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes" (L.Ortiz-Ortiz, L.F. Bogalil and V.Yakoleff, Eds.) pp 453-472, Academic Press, Orlando.
- GOODFELLOW M., STANTON L.J., SIMPSON K.E. and MINNIKIN D.E., (1990) -Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes- J.Gen.Microbial., 96, 351-358.

GOTTLIEB D., (1974) -Actinomycetales- in: "BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY" 8th Ed. Buchanan R.E. and Gibbowski M.E. (Eds.), pp 657-881, The Williams and Wilkins Company. Baltimore

HACENE H., (1992) -Sélection de souches d'Actinomycètes "rares" productrices d'activités antifongiques de nature non polyénique. Purification et caractérisation des principaux antibiotiques synthétisés- Thèse de Doctorat Es-Sciences, option microbiologie, U.S.T.B., ALOER. 281p.

HACENE H., SABAOU N., BOUNAGA N., GERMAIN P. et LEFEBVRE G., (1993) -Etude des antibiotiques produits par une souche *Spirillospora*- Fifth. conference of the European Actinomycetes group.

HACENE H., SABAOU N., BOUNAGA N. and LEFEBVRE G., (1994a) -Screening for non polyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales- *Microbios.*, 79, 81-85.

HACENE H., KEBIR K., SIDOTHMAN D. and LEFEBVRE G., (1994b) -HM17, a new polyene antifungal antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*- *Journal of Applied Bacteriology.* 77, 484-489.

HACENE H. and LEFEBVRE G., (1995a) -AH17 2 new non polyenic antifungal antibiotic produced by a strain of *Spirillospora*- *Microbios*, 205: 191-205.

HACENE H., (1995b) -la pollution dans les régions arides, cas du lac d'El Goléa- *Santé plus* n° 45: 36-38.

HACENE H. and LEFEBVRE G., (1996) -HP17, 2 new polyenic antibiotics produced by a new strain of *Spirillospora*- *Journal Applied of Biotechnology* 80: 565-569

HEDGE V., BARRETT T., GULLO V., HORAN A., Mc PHAIL A.T., MARQUEZ J., PATEL M. and PUAR M., (1986)-A novel naphthaquinone antibiotic Sch 38519 produced by a *Thermonospora*- 26th Interscience Congress on Antimicrobial Agents and chemotherapy, Abstract 908.

HENRICI A.T., (1939)- *The Biology of Bacteria. An introduction to general microbiology*- Ed.Boston.



HIRSH C.F. and MACCANN-MAC CORMICK P.A., (1985) -Biology of *Streptomyces*- in: "Biology of industrial microorganisms" DEMAIN A.L. and SOLOMON N.A., Eds. pp 291-314. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sidney, Tokyo.

HOCHLOWSKI J.E., SWANSON S.J., WHITTERM D.N., BUKO A.N. and McALPINE J.B., (1986) -Tiacumicins a novel series of 18 membered macrolide antibiotics II. Isolation and elucidation of structures- 26th. Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy., Abstract 937.

HUCK T.A., POTER N. and BUSHEL M.E., (1991) -Positive selection of antibiotic producing soil isolates. Culture medium optimization- J.Gen.Microbiol. 137, 2321-2329.

JOURNAL OF ANTIBIOTICS (1975-1982) in:"Biology of Industrial Microorganisms" DEMAIN A. and SALOMAN N.A., (1985) 573pp. Benjamin Cummings Publishing Company, London.

KARWOWSKI J.P., JACKSON M., THERIANET R.J., PROKOP J.F., MAUS M.L. and HENSEY D.M., (1986) -Arizonins, a new complex of antibiotics related to Kalafungin I. Taxonomy, Fermentation and Biological Activity- 26th. Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

KAYAMURA Y. and TAKADA H., (1970) -Some characteristics of a *Streptomyces* Ky67, isolated from salt farm in Japan- Trans. Mycol. Soc. Japan, 11, 7-10.

KUSHNER D.J., (1978) -life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria- in: "Microbial life in extreme environments" Ed. KUSHNER D.J. Academic Press London, pp 317-368.

KÜTZING F.T., (1833) -*Sphaerotilus natans*, nouvelle souche aquatique- Linnaea, 8, 385.

LACEY J., (1988) -Actinomycetes in biodegradation and as pollutants of the working environment- in: "Actinomycetes in biotechnology" GOODFELLOW M., WILLIAMS S.T. and MORDARSKI M., Coord. Sous presse. Ac. Press, London.

- LARPENT J.P. and SANGLIER J.J., (1989) -Biotechnologie des antibiotiques- Masson. Paris. 481p.
- LARSEN in RUSSEL N.J., (1988) -membranes adaptatives of halotolerant and halophilic- Journal of biogeities and biomembranes, Vol 21, 11, pp3-11.
- LECHEVALIER H.A. and LECHEVALIER M.P., (1967) -Biology of actinomycetes- Ann.Rev.Microbiol.21, 71-100.
- MAC ALPINE J.B., TUAN J.S., BROWN D.P., GREBNER K.D., WHITTERN D.N., BUKO A. and KATZ L., (1987) -New antibiotics form genetically engineered actinomycetes. 1.2 noreythromycins, isolation and structural determination- J.Antibiot.40, 1115-1122.
- McCARTHY A.J. and WILLIAMS S.T., (1990) -Methods for studying the ecology of actinomycetes- in: "Methods in Microbiology" Vol22.
- MARIAT F. et SEBALD M., (1970) -Les actinomycètes- in: "Bactériologie médicale" LEMINOR L. et VERON M., (1982).
- MERCK E., (1975) -Réactifs révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier- Darmstadt.149p.
- MOHAN RAO M., MIGLANI B.D. and ELLAIAH P., (1982) -Antibiotics from rare actinomycetes- Chemical Abstracts and International Pharmaceutical Abstracts, Indians Drugs, February, 1982.
- MORDASKI M., (1985)-Detection of ribosomal nucleic acid homologies- in:"Chemical methods in bacterial systematic" pp 41-66. Ac.Press.London.
- NAIR M.G., PUTMAN A.R., MISHRA S.K., TAFT W.H., KELLER J.E., and MILLER J.R., (1989) -Fariefungin: a new broad spectrum antibiotics from *Streptomyces griseus* var.*autotrophicus*- J.Nat.Products, 52, 4, 797-809.
- NAKAYAMA K., (1981) -Sources of industrial microorganisms- in: "Biotechnology" a comprehensive treatise in 8 volumes edited by REHM H.J. and REED G. Volume 1: Microbials Fundamentals pp 355-394.

NISBET L.J., (1982) -Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites- J.Chem.Tech.Biotechnol. **32**, 251-270.

NOLAN R.D., and CROSS T., (1988) -Isolation and screening of Actinomycètes- in: "Actinomycetes in biotechnology" GOODFELLOW M., WILLIAMS S.T. and MORDARSKI N. (Eds)- Sous Presse Ac.Press.

OMURA S., (1986) -Philosophy of new drugs discovery- Microbiol.Rev. **50**, 259-279.

PIRET J.M. and DEMAÏN A.L., (1988)-Actinomycetes in biotechnology: an overview- in:"Actinomycetes in Biotechnology" GOODFELLOW M., WILLIAMS S.T. and MORDASKI N. (Eds.)Sous press ac press.

PISANO A.M., SOMMER M.J., and BRETT B.P., (1987) -Hudson River sediments as source of actinomycetes exhibiting antifungal activity- Appl.Microbiol.Biotechnol. **27**, 214-217.

PRINGSHEIM E.G., (1948) -Iron bacteria- Botany School, University of Cambridge, pp 200-244.

RODIER J., (1976)-l'analyse de l'eau- Bordas, Paris, Tome1:629p.

SABAOU N., BOUNAGA N. et BOUNAGA D., (1983)-Actions antibiotique, mycolytique et parasitaire de deux actinomycètes envers *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et autres formes spéciales.- Can.J.Microbiol. **29**:194-199.

SHIRLING E.B. and GOTTLIEB D., (1966) -Methods for characterization of Streptomyces species- Int.Syst.Bacteriol. **16**, 313-340.

SHIRLING E.B. and GOTTLIEB D, (1968a) -Cooperative description of the cultures of *Streptomyces*. III Additional species descriptions from first study- Int.J.Syst.Bacteriol. **18**, 69-189.

SHIRLING E.B. and GOTTLIEB D, (1968b) -Cooperative description of the cultures of *Streptomyces*. III Additional species descriptions from first and second studies- Int.J.Syst.Bacteriol. **18**, 279-392.

- SHOMURA T., YOSIDA Y., AMANO S., KOJIMA M., INOUE S., NIIDA T., (1979) -Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii* strain SE 1993- Jantibiotics, **32**, 427-435.
- VALERA F.RODRIGUEZ, VENTOSA A., JUEZ G. and IMHOFF J.F., (1985) -variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern- Microbial Ecol **11**, 105-107.
- VAN ITTERSON (1958) -le genre *Gallionella*- in: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (1974) 8th Edition. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1268p.
- WALSH.F. and MITCHELL R., (1972) -An acid-tolerant iron oxidizing *Metallogenium*- Journal of General Microbiology, **72**, 369-376.
- WATANAB T., SUGIYAMA T., TAKAHASHI M., SHIMA J., (1992) -New polyenic antibiotic active against Gram+ and Gram- bacteria- Jantibio., **45**, 4, 470-475.
- WEILAND H., (1981) -Distribution of actinomycetes on the sea floor- in: "Actinomycetes" SCHAAL K. and PULVERER G., Eds. pp 186-193. Zbe Bakt.Suppl.11, Gustav Fisher Verlag., Stuttgart, New York.
- WILLIAMS S.T., LANNING S. and WELLINGTON E.M.H, (1984) in:"The Biology of the Actinomycetes" (M.GOODFELLOW, M.MORDARSKI and S.T. WILLIAMS Eds.) pp481-528, Academic Press, London.
- WILLIAMS S.T., SHARPE M.E. and HOLT J. (Editions), 1989. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol4. Williams and Wilkins, Baltimore.
- WOOD S., WILLIAMS S.T., FWHITE W.R., (1985)-Potential sites of geosmin production by *Streptomyces* in and around reservoirs- J.Appl.Bacterial., **58**, p319-326.
- ZAVARIN et HIRSH -le genre *Gallionella*- in: "Bergey's Manual of determinative Bacteriology" (1974) 8th Edition. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1268p.

## ANNEXE I

### MILIEUX DE CULTURE POUR L'ETUDE MORPHOLOGIQUE

#### 1 - Milieu ISP<sub>2</sub> (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

Extrait de levure : 4g  
Extrait de malt : 10g  
Glucose : 4g  
Agar : 20g  
Eau distillée : 1000ml  
pH = 7,2

#### 2 - Milieu ISP<sub>3</sub> (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

Farine d'avoine : 20g  
Solution saline standard : 1ml  
Agar : 20g  
Eau distillée : 1000ml  
pH = 7,2

\* Solution saline standard :  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,1g ;  $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$  : 0,1g  
 $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,1g ;  
eau distillée:1000ml

#### 3 - Milieu ISP<sub>4</sub> (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

Amidon : 10g  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 1g  
 $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 1g  
NaCl : 1g  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 2g  
 $\text{CaCO}_3$  : 2g  
Solution saline standard (voir ISP<sub>3</sub>) : 1ml  
Agar : 20g  
Eau distillée : 1000ml  
pH = 7,2

## ANNEXE II

### MILIEUX DE CULTURE POUR L'ETUDE MORPHOLOGIQUE DES BACTERIES METALLIQUES

Milieu PRINGSHEIM (PRINGSHEIM, 1948)

Extrait de levure	: 0,5g
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	: 0,2g
Agar	: 0,01g
Eau distillée	: 1000ml
pH = 7,2	

## ANNEXE III

### 1) MILIEUX UTILISES POUR LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES

#### Milieu n° 1 : (Milieu ISP<sub>2</sub>)

Extrait de levure	: 4g
Extrait de malt	: 10g
D.glucose	: 4g
Eau distillée	: 1000ml
pH = 7,2	

#### Milieu n° 2 : Bouillon nutritif

Peptone	: 5g
Extrait de viande	: 5g
Nacl	: 5g
Eau distillée	: 1000ml
pH = 7-7,2	

#### Milieu n° 3 : Milieu PRINGSHEIM (PRINGSHEIM, 1948)

Extrait de levure	: 0,5g
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	: 0,2g
Agar	: 0,01g
Eau distillée	: 1000ml
pH = 7,2	

### 2) MILIEUX UTILISES POUR LA CROISSANCE DES CHAMPIGNONS

#### Milieu Sabouraud

D.glucose anhydre	: 30g
Néo.peptone	: 10g
Eau distillée	: 1000ml
Agar	: 15g
pH = 7	

### 3) MILIEU UTILISE POUR LA CROISSANCE DES BACTERIES

Agar nutritif	
Peptone	: 5g
Extrait de viande	: 5g
NaCl	: 5g
Eau distillée	: 1000ml
Agar	: 15g



## ANNEXE IV

### LES REVELATEURS CHIMIQUES

(MERCK, 1975)

- 1 - Ninhydrine : révélateur des amines, acides aminés et osamines.  
Ninhydrine : 0,2g  
Acétone : 100ml  
Après chauffage à 110°C (5mn), des taches violettes ou roses sont visibles.
  
- 2 - Nitro-4 aniline diazotée (tamponnée), réactif des phénols:  
Réactif de vaporisation: mélanger en refroidissant 5ml d'une solution de nitro-4 aniline (à 0,5% dans l'acide chlorhydrique 2N) avec 0,5ml d'une solution de nitrate de sodium (à 0,5% dans l'eau), ajouter 15ml d'une solution d'acétate de sodium (à 20% dans l'eau).
  
- 3 - Aniline phtalate, réactif des sucres réducteurs et des ions halogénures:  
Solution à vaporiser: dissoudre 0,93g d'aniline et 1,66g d'acide O-phtalique dans 100ml de butanol saturé avec de l'eau.  
Traitement complémentaire: chauffer pendant 10mn à 105°C; les tâches apparaissent roses pour les pentoses et brunes pour les hexoses.