

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Constantine 1-Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



N° d'ordre : 185/DS/2018
N° de série : 03/MicrB/2018

THÈSE

En vue de l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Microbiologie Appliquée et Biotechnologies Microbiennes

Présentée par :

LEULMI Nassima

Thème de recherche

**Identification polyphasique des souches d'actinobactéries isolées
d'échantillons de sols semi-arides. Caractérisation structurale des
antibiotiques produits**

Soutenue publiquement le 25/10/2018,

Devant le jury :

Présidente : M^{me} Z. MERAIHI	Prof. Université des Frères Mentouri (Constantine).
Directeur de thèse : M^r A. BOULAHROUF	Prof. Université Frères Mentouri (Constantine).
Examineurs : M^{me} L. SOUIKI	Prof. Université 8 Mai 1945 (Guelma).
M^r Z. BRANES	Prof. Université Badji Mokhtar (Annaba).
M^r A. ZELLAGUI	Prof. Université Larbi Ben Mhidi (Oum El Bouaghi).

Année universitaire : 2018 – 2019

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire sont le fruit d'une collaboration entre deux équipes d'une part le laboratoire de Génie microbiologique et applications, Université Frère Mentouri, Constantine 1, et d'autre part le laboratoire de Chimie Bio-organique, département de physique, Université Trento, Italie.

Je tiens à témoigner ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, Pr. BOULAHROUF Aberrahmane pour son soutien inconditionnel et ses encouragements, précisément aux périodes où j'en ai eu le plus grand besoin. Merci pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée. Merci pour votre aide et précieux conseils qui m'ont permis d'évoluer dans la réalisation de cette thèse...

Je souhaite ensuite adresser mes plus chaleureux remerciements au Professeur MANCINI I. directrice du laboratoire de chimie bioorganique qui m'a accueillie au sein de son équipe et a dirigé la partie chimique de ce travail. C'est grâce à vous, que ces travaux ont vu le jour et qu'ils ont finalement abouti. Votre présence quotidienne, vos conseils avisés, votre encouragement, votre disponibilité et votre constance ont été essentiels. Un grand merci.

Je tiens, à remercier également, les membres du jury. Je remercie, particulièrement, Madame MERAIHI Z. de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je suis également reconnaissante envers les Professeurs ; Madame SOUIKI L., Monsieur Zellagui A. et Monsieur Branes Z. d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je souhaite remercier sincèrement Monsieur Alessandro Quattrone, Directeur de CIBIO, université de Trento, pour son accueil dans son laboratoire dont lequel une partie de ce travail a été réalisé.

Merci au Docteur Andrea Defant, laboratoire de chimie bioorganique, pour les traitements en analyse computationnelle réalisés dans ce manuscrit, mais également pour son aide dans leur interprétation.

Je voudrais remercier chaleureusement Denise Sighel, laboratoire de chimie bioorganique, département de physique, université Trento, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, son aide, sa faculté d'écoute et sa contribution lors de la rédaction de mon article.

Un remerciement spécial à Mario Rosi, technicien du laboratoire de chimie bioorganique l'université Trento, Italie, pour m'avoir appris à manipuler les différentes techniques de séparation et de purification.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire de chimie bioorganique Université Trento, particulièrement, Lessandro, Aderiano, andrea et Rogero,

Un grand merci adressé au docteur Nicola Bazanella, Roserela et Margaritha pour les facilites qu'ils m'ont données.

Un grand Merci également à l'université Trento, Departement de CIBIO, pour m'avoir accepté de suivre des formations en spectrométrie de masse, en RMN et en métagénomique.

Mes remerciements les plus profonds et sincères s'adressent à mon amie docteur MERABTI Ryma, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), Université Constantine 1, pour son soutien particulièrement aux moments difficiles et son aide précieuse. Un grand merci.

Merci encore à Alessia pour m'avoir corrigé l'anglais du texte de mon article.

Je remercie l'état Algérienne et principalement le Ministère de l'Enseignement Supérieur pour l'octroi d'une bourse d'étude à l'Italie. me permettant ainsi de consacrer tous mon temps à réaliser tranquillement mon travail de recherche.

Un grand merci à mes chères amies HARZALAH Besma et KHENAKHA Karima

Je terminerai en adressant un très grand merci à ma famille (particulièrement ma mère) pour son soutien sans faille et de tous les instants.

.

Je dédie cette thèse :

A la mémoire de mon Père :

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

A ma chère mère

*En hommage à tous les sacrifices que tu as consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je te remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité. Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer réellement ta juste valeur. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre t'exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être toujours avec moi. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi.
ma chère maman je t'aime.*

A mon très cher mari Mostefa

Cher mari j'aimerais bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et ton soutien, tes encouragements pendant toute cette période de thèse et ta présence à mes côtés dans les moments de joie et de peine.

A Mon Très Cher Petit Poussin Mohamed Firas

qui m'a donné un coup de pouce pour compléter ma thèse.

Ma sœur Nadia et son mari Mourad

Mes neveux et mes nièces : Wassim, Anis, Rahma, Rassim et Besma

Mes adorables frères Noredine, walid et sa femme, khalil et Imed

A la mémoire de mon beau père

Ma belle mère

À tous les membres de ma famille.

À mes chères amies « Karima », « Besma », « Ryma », « Zeineb », « Ilhem », « Nabila » et « Aicha »

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur

Les principales publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu :

Publication

LEULMI N., SIGHEL D., DEFANT A., KHENAKA K., BOULAHROUF A. & MANCINI I. (2018) Nigericin and grisorixin methyl ester from the Algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain: a computational study on their epimeric structures and evaluation of glioblastoma stem cells growth inhibition, *Natural Product Research*, DOI: **10.1080/14786419.2018.1446014**. Taylor & Francis Group. Catégorie A.

Communications

LEULMI N., AOUAR A., KHENAKA K., MEROUANE F. & BOULAHROUF A. *Streptomyces griseus* lac 1 : évaluation de l'activité antimicrobienne. Le 25^{ème} Forum de des sciences et de biotechnologie. **24 au 27 Mars 2014. Hammamat. Tunisie.**

LEULMI N., AOUAR L., KHENAKA K. & A BOULAHROUF A. Antibacterial Activity of *Streptomyces griseus* lac 1 against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, Acinetobacter and Various Other Pathogens. **1er congrés international de Biotoxicologie et Bioactivité. 26 et 27 Novembre 2014. Oran, Algérie.**

AOUAR L., KHENAKA K., **LEULMI N.**, LERAT S., BOULAHROUF A., BEAULIEU C. In vitro and in planta antagonism of actinomycetes against *Streptomyces scabies* EF-35. International Symposium on Genomics, Metagenomics, **Plant Biotechnology, Environment and Health. 22-24 novembre, 2015. Biskra. Algérie.**

LEULMI N., KHENAKA K., AOUAR L., BOULAHROUF A. & MANCINI I. Antibiotic polyethers produced by the algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* strain. **IV international conference on Antimicrobial Research. 29june-01 July 2016. Torremolinos, Malaga, Spain.**

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

INTRODUCTION	01
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Le genre <i>Streptomyces</i>	03
1.1. Généralités	03
1.2. Cycle de développement de <i>Streptomyces</i>	04
1.3. Génétique de <i>Streptomyces</i>	06
1.3.1. Plasticité du Génome de <i>Streptomyces</i>	06
1.3.2. Instabilité du génome de <i>Streptomyces</i>	08
1.4. Le genre <i>Streptomyces</i> du sol forestier	09
1.5. <i>Streptomyces</i> et antibiotique	11
2. Les polyéthers	14
2.1. Caractéristiques générales	14
2.2. Les polyéthers ionophores	14
2.2.1. Introduction	14
2.2.2. Structure des polyéthers ionophores	15
2.2.3. Biosynthèse des polyéthers ionophores	17
2.2.4. Propriétés biologiques	20
2.2.5. Mécanisme d'action des polyéthers ionophores	21
3. Techniques d'études des molécules antimicrobiennes	21
3.1. Introduction	21
3.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	22
3.3. La spectrométrie de masse	27
4. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	30
5. Spectroscopie Infra-Rouge (IR)	32

ÉTUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Isolement et caractérisation polyphasique d'actinobactéries producteurs d'antimicrobiens. Antagonisme d'isolats représentatifs

Matériel et méthodes

1. Prélèvement des échantillons	34
2. Isolement, purification et conservation des actinobactéries	35
3. Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries	35
3.1. Activité antibactérienne	35
3.2. Activité antifongique	36
4. Antagonisme d'isolats sélectionnés producteurs d'antimicrobien	37
5. Identification des souches possédant une activité antimicrobienne	37
5.1. Caractères morphologiques et cultureux	37

5.2. Aspect des souches en microscopie optique (Technique des lames et lamelles)	37
5.3. Aspect des souches en microscope électronique à balayage (MEB)	38
5.4. Analyse des constituants pariétaux (chimiotaxonomie)	39
5.4.1. Production de biomasse	39
5.4.2. Détermination des acides aminés pariétaux	40
5.4.3. Détermination des sucres pariétaux	40
6. Étude des caractères physiologiques	41
6.1. Pigments diffusibles et pigments mélanoides	41
6.2. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques	41
6.3. Action sur le lait écrémé	41
6.4. La résistance aux antibiotiques	41
7. Étude des caractères biochimiques	42
7.1. Utilisation des composés glucidiques	42
7.2. Utilisation des sources azotées	42
7.3. Production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S)	42
7.4. La production de la chitinase	42
7.5. Réduction des nitrates	43
7.6. Les activités d'hydrolyse	43
8. Identification phylogénétique	44
8.1. Extraction de l'ADN	44
8.2. Quantification de l'ADN	44
8.3. Amplification des séquences d'ADNr 16S	44
8.4. Séquençage de l'ADNr 16S et analyses phylogénétiques	45

Résultats

1-Isolement et purification des actinobactéries	46
2. Activité antimicrobienne	47
2.1. Des isolats d'actinobactéries du sol rhizosphérique	47
2.2. Des isolats d'actinobactéries du sol montagneux	49
2.3. Des isolats d'actinobactéries du sol environnant de la Sebka	50
3. Antagonisme des isolats producteurs d'antimicrobiens sélectionnés	50
4. Identification des souches	51
4.1. Aspect macroscopique	51
4.2. Aspect en microscopie optique et électronique	54
4.3. Chimiotaxonomie	54
4.4. Caractères physiologiques	54
4.5. Caractères biochimiques	56
4.6. Étude phylogénétique	58

Discussion	59
------------	----

Chapitre 2 : Production, extraction et purification des biomolécules produites par les souches S. youssoufiensis SF10, S. coeruleorubidus SFKH10 et S. spororaveus SFKH4

Matériel et méthodes

1. Extraction à grande échelle des molécules bioactives produites par

les trois souches.	66
2. Test d'activité antimicrobienne.	67
3. Purification des biomolécules produites	68
3.1. Par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10	68
3.2. Par la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10	70
3.3. Par la souche <i>S. spororaveus</i> SFKH4	70
 Résultats	
1. Extraction des biomolécules	71
1.1. De la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10	71
1.2. De la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10	75
1.3. De la souche <i>S. spororaveus</i> SFKH4	76
2. Purification des biomolécules	78
2.1. De la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10	78
2.2. De la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10	82
2.3. De la souche <i>S. spororaveus</i> . SFKH4	85
 Discussion	88
 <i>Chapitre 3 : Étude structurale des biomolécules pures produites par les souches S. youssoufiensis SF10 et S. coeruleorubidus SFKH10.</i>	
 Matériel et méthodes	
1. Test antimicrobien des molécules pures produites par les souches <i>S. youssoufiensis</i> SF10 et <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	92
2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	92
3. Spectrométrie de masse.	93
4. Spectrométrie de masse en tandem (MS-MS)	94
5. Pouvoir rotatoire	94
6. Spectroscopie UV-Visible	94
7. Spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier	94
8. Étude computationnelle sur les polyéthers épimères (M4, M5, et M6)	95
 Résultats	
1. Activité antimicrobienne des molécules pures	95
2. Résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse et infra-rouge	96
2.1. Étude de molécules (M3, M4, M5, M6) produites par la souche <i>Streptomyces youssoufiensis</i> SF10	96
2.2. Étude de la molécule produite par la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10 (molécule C1)	103
3. Analyse computationnelle de l'épimérisation structurale de la nigéricine et de la grisorixine méthyle ester	105
 Discussion	108
 <i>Chapitre 4 : Étude de la cytotoxicité de deux composés purs : la nigéricine (M4) et la grisorixine méthyle ester (M6) produits majeurs de la souche S. youssoufiensis SF10.</i>	
 Matériel et méthodes	

1. Culture cellulaire.	
1.1. Neurosphères en suspension.	112
1.2. Entretien des cultures secondaires de neurosphères	112
1.3. Cellules adhérentes	113
2. Test de cytotoxicité in vitro	113
3. Analyse statistiques	113
Résultats	114
1. Test de cytotoxicité	
Discussion	114
	116
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
ANNEXES	122
ARTICLE	

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection.

CDCl₃ : Chloroform deutéré.

CI₅₀ : Concentration qui inhibe de moitié la prolifération cellulaire globale.

CLHP : chromatographie liquide à haute performance.

CLSM : Confocal laser scanning microscope.

COSY : COrrelation SpectroscopY.

DAD : Diode array detector (en français : détecteur UV à barrette de diode).

DCM : Dichlorométhane.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

GBM : Glioblastome multiforme.

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

HR-ESI/MS : Spectromètre de masse haute résolution avec ionisation par électrospray.

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation.

Hz : Hertz.

J : constante de couplage.

IR : Infra-rouge.

kPa : Kilopascal.

LC/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Mbp : mega base pairs.

Me : Méthyle (CH₃).

MeOH : Méthanol.

SM : Spectrométrie de masse.

pg : Picogramme.

PKs : La polyketide synthase.

PSA : Polar surface area.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

RP : Reversed phase (phase inverse).

SET: Saline /EDTA/ Tris-HCl.

TE: tris/EDTA.

TIR : Terminal Inverted Repeat.

tr/min : Tours par minute.

tR : Temps de rétention.

u.a. Unité atomique.

Liste des figures

Figure 1: cliché de microscopie électronique à balayage illustrant le genre <i>Streptomyces</i> en sporulation.	04
Figure 2: cycle de développement de <i>Streptomyces</i> dans un milieu solide.	05
Figure 3: analyse par un microscope confocal à balayage laser (CLSM) du cycle de développement de <i>S. coelicolor</i> A3(2) dans un milieu submergé.	06
Figure 4: représentation schématique du chromosome linéaire de <i>S. ambofaciens</i> .	08
Figure 5: mécanisme d'action des différents types d'antibiotiques.	12
Figure 6: nouvelles approches de la production des antibiotiques par le genre <i>Streptomyces</i> .	13
Figure 7: structure de la salinomycine en complexe cristallin.	15
Figure 8: exemples de la complexité et de la diversité des polyéthers ionophores.	16
Figure 9: hypothèse de la voie de biosynthèse de la monensine A.	18
Figure 10: les intervenants dans la voie de biosynthèse de l'indanomycine.	19
Figure 11: instrumentation dans l'UV/Visible.	25
Figure 12: principe du détecteur à barrette de diodes.	25
Figure 13: schéma représentatif de détecteur évaporateur à diffusion de lumière.	26
Figure 14: configuration instrumentale d'un système de spectrométrie de masse.	28
Figure 15: principe de l'électrospray ionisation (a), formation de nébulisat (b).	29
Figure 16: orientation des protons en absence et en présence d'un champ magnétique.	30
Figure 17: représentation schématique d'une expérience RMN.	31
Figure 18: spectres électromagnétiques.	33
Figure 19: microscope électronique à balayage (SEM), université Trento, Italie.	39
Figure 20: photographie de colonies d'actinobactéries sur milieu Olson.	46
Figure 21: aspect sur milieu solide <i>YMEA</i> +CaCO ₃ des isolats purs d'actinobactéries.	47
Figure 22: activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique), sur milieu <i>YMEA</i> +CaCO ₃ des isolats purs d'actinobactéries, évaluée par la technique des cylindres d'agar.	49
Figure 23: culture de l'isolat SFKH4 sur différents milieux de cultures.	51

Figure 24: la morphologie des chaînes de spores: (a) SF10, (b) SFKH4, (c) SFKH10, après 14 jours de croissance sur milieu <i>YMEA</i> , par microscope électronique à balayage	53
Figure 25: production de pigment mélanoïde.	54
Figure 26 : photographies de la sensibilité/résistance des souches SF10, SFKH4, SFKH10 aux antibiotiques.	55
Figure 27: arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant les positions taxonomiques des souches SF10, SFKH4 et SFKH10.	59
Figure 28: spectre dans l'UV- Visible de l'extrait sec brut bioactif dissous dans le méthanol, de la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	72
Figure 29: RMN ¹ H (CDCl ₃) de l'extrait sec brut bioactif d'acétate d'éthyle de la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	72
Figure 30: analyse par micro-CLHP-MS de l'extrait acétate d'éthyle provenant de la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	74
Figure 31: spectres de masse en tandem MS/MS et MS/MS/MS du l'ion m/z 747, enregistrés en mode positif [M+Na] ⁺ .	74
Figure 32: spectre dans l'UV-visible de l'extrait sec brut actif dissous dans le méthanol, de la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	75
Figure 33: spectre RMN ¹ H (CDCl ₃) de l'extrait sec brut bioactif de la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	76
Figure 34: spectre d'absorption dans l'UV-Visible de l'extrait sec brut bioactif dissout dans le méthanol, de la souche <i>S. spororaveus</i> SFKH4.	77
Figure 35: le spectre RMN ¹ H (CDCl ₃) de l'extrait sec brut actif de la souche <i>S. spororaveus</i> SFKH4.	77
Figure 36 : chromatogramme de la fraction active 20-23 analysé par CLHP-DAD-ELSD.	81
Figure 37: schéma de purification de métabolites présents dans l'extrait brut bioactif de la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	82
Figure 38: spectre RMN ¹ H (CDCl ₃) de la fraction Fr. 12 issue de l'extrait actif de la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	84
Figure 39 : chromatogramme, de la fraction Fr. 12, obtenu par LC-MS.	84
Figure 40: les signaux de la spectrométrie de masse et masse en tandem MS/MS enregistrés au mode positif [M+Na] ⁺ de la fraction Fr. 15.	87
Figure 41: spectre de masse enregistré au mode positif [M+Na] ⁺ de la fraction Fr. 16.	87

Figure 42: RMN ^1H (CDCl_3) de la fraction Fr. 15 (a) et Fr. 16 (b).	88
Figure 43: instrument de la résonance magnétique nucléaire (Bruker AVANCE 400). laboratoire de chimie bio-organique, université Trento, Italie.	93
Figure 44: spectres de masse du composé actif M4 produit par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10 enregistré en mode positif et négatif.	97
Figure 45: la masse en tandem MS/MS et MS/MS/MS du composé M4 produit par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10, enregistrés en mode positif.	98
Figure 46: structure de la molécule M4 produite par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	98
Figure 47: spectre de masse du composé actif M3 produit par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	99
Figure 48: La masse en tandem MS/MS et MS/MS/MS du composé M3 produit par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10, enregistrés en mode positif.	100
Figure 49: structure de la molécule M3 produite par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	100
Figure 50: structure de la molécule M5 produite de la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	101
Figure 51: spectre de masse du composé actif M6 produit par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10, enregistré en mode positif et négatif.	102
Figure 52: la spectrométrie de masse tandem MS/MS et MS/MS/MS du composé M6 produit par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10, enregistrés en mode positif.	103
Figure 53: structure de la molécule M6, produite par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	103
Figure 54: spectre de masse du composé C1 en mode positif de la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	104
Figure 55: structure chimique du composé C1 produit par la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	104
Figure 56: structure chimique des polyéthers abierixine, nigéricine, épinigéricine et grisorixine méthyle ester produits par la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	105
Figure 57: a. Des courbes dose-réponse des cellules de glioblastomes (COMI et VIPI) traitées par la nigéricine et grisorixine méthyle ester. b. Valeurs de CI_{50} de la nigéricine et de la grisorixine méthyles ester.	115

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition du milieu réactionnel de la PCR de l'ADNr 16S par la paire d'amorces universelle.	45
Tableau 2 : nombre d'isolats d'actinobactéries par site exploré.	46
Tableau 3 : activité antimicrobienne des isolats du sol rhizosphérique.	48
Tableau 4 : activité antimicrobienne des isolats de sol forestier (Djebel Chélia).	49
Tableau 5 : activité antibactérienne des isolats de sol environnant de la Sebka.	50
Tableau 6 : activité antagoniste vis-à-vis <i>Streptomyces scabies</i> des trois isolats.	50
Tableau 7 : aspect macroscopique des isolats sélectionnés.	52
Tableau 8 : croissance des isolats étudiés en présence d'inhibiteurs.	55
Tableau 9 : résultats de la sensibilité aux antibiotiques.	56
Tableau 10 : utilisation des sucres par les isolats étudiés.	56
Tableau 11 : utilisation des composés azotés organiques.	57
Tableau 12 : activité hydrolytique des isolats.	57
Tableau 13 : affiliation phylogénétique des trois isolats (paire d'amorces universelle).	58
Tableau 14 : quelques caractéristique physiologiques de l'isolat SF10 (1) et ses souches apparentées	64
Tableau 15 : activités biologiques de l'extrait sec brut provenant de la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	71
Tableau 16 : activités biologiques de l'extrait sec brut collecté de la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	75
Tableau 17 : activités biologiques de l'extrait sec brut de la souche <i>S. spororaveus</i> SFKH4.	76
Tableau 18 : activités biologiques des fractions obtenues à partir de l'extrait brut de la souche <i>S. youssoufiensis</i> SF10.	79
Tableau 19 : activité des fractions en (mm), obtenues par chromatographie sur colonne, de l'extrait sec brut bioactif provenant de la souche <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	83

Tableau 20 : analyse par LC-MS de la fraction Fr. 12. Les temps de rétention et les masses sont indiquées.	85
Tableau 21 : activités biologiques (mm) des fractions de l'extrait provenant de la souche <i>S. spororaveus</i> SFKH4.	86
Tableau 22 : activité antibactérienne des molécules pures produites par les souches <i>S. youssoufiensis</i> SF10 et <i>S. coeruleorubidus</i> SFKH10.	96
Tableau 23: les valeurs d'énergie calculées par TFD à un niveau théorique B3LYP/6-31G(d,p) du cycle F des structures simples prise comme modèles.	107
Tableau 24: inhibition in vitro des cellules de glioblastomes VIPI et COMI par la nigéricine et la grisorexine méthyle ester.	116

RESUMES

Résumé

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses, habitant principalement le sol. Elles sont connues par la production d'une grande diversité de molécules bioactives, notamment les antibiotiques. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail de recherche. Pour cela, 99 isolats d'actinobactéries, ont été obtenus à partir d'échantillons de sols, semi-arides algériens, peu exploités ; sol rhizosphérique (Pin d'alep Wilaya de khenchela), sol montagneux (Djebel Chélia, Wilaya de Khenchela) et sol de Sebkhha (Wilaya d'Oum El bouaghi). Le criblage préliminaire basé sur l'activité antimicrobienne, a permis la sélection de trois isolats très performants ; SF10, SFKH4 et SFKH10. L'étude phénotypique et chimiotaxonomique, des trois isolats, a permis de les affilier au genre *Streptomyces*. L'analyse phylogénétique a permis d'attribuer les isolats SF10, SFKH4 et SFKH10, respectivement, aux espèces *Streptomyces youssoufiensis*, *Streptomyces spororaveus* et *Streptomyces coeruleorubidus* avec des pourcentages de similarité de 99,8%, 99% et 99%, respectivement.

L'activité antimicrobienne a été réalisée contre plusieurs microorganismes-tests, en utilisant les extraits de molécules produites par les trois souches après culture en milieux solides et extraction par l'acétate d'éthyle. La structure des molécules actives, purifiées par différentes méthodes chromatographiques, a été réalisée en couplant plusieurs techniques de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN ^1H , RMN ^{13}C , MS, MS tandem, IR et UV-Visible). La souche *Streptomyces. youssoufiensis* SF10, a produit plusieurs molécules appartenant à la famille des polyéthers ionophores ; abierixine, nigéricine, épiginigéricine et la nouvelle molécule grisorixine méthyle ester. Par ailleurs, une seule molécule, appartenant à la famille des macrotétrolidés (la dinactine), a été obtenue de la souche *Streptomyces coeruleorubidus* SFKH10. De plus, l'étude préliminaire des molécules sécrétées par la souche *Streptomyces spororaveus* SFKH4 a montré sa richesse en composés très complexes de haut poids moléculaire.

Afin d'obtenir la stabilité relative des épimères (nigéricin/épiginigéricin et grisorixin/épigrisorixin), des calculs de DFT (*Density Functional Theory*) ont été effectués. Les résultats sont d'un intérêt général car elles peuvent être appliquées à une large gamme de polyéthers naturels polycycliques.

D'autre part, l'étude de la cytotoxicité des molécules purifiées et identifiées a révélé que la nigéricine et la grisorixine méthyle ester ont affecté la prolifération des cellules souches du glioblastome humain de manière dose-dépendante, avec une activité plus élevée pour la grisorixine méthyle ester dont les valeurs de CI_{50} sont 3,85 et 3,05 μM pour les cellules souches du glioblastome VIPI et COMI, respectivement.

En conclusion, la présente étude a permis de révéler le potentiel des écosystèmes semi-arides algériens comme étant des réservoirs importants de souches d'actinobactéries productrices de molécules bioactives, notamment la souche *Streptomyces youssoufiensis* SF10 dont les métabolites ont été caractérisés pour la première fois par la méthode Bioguidé. La forte cytotoxicité de la nouvelle molécule grisorixine méthyle ester représente un point de départ pour le développement de nouveau traitement contre le glioblastome multiforme.

Mots clés : Actinobactéries, *Streptomyces*, sols semi-arides, antibiotiques, polyéthers ionophores, cytotoxicité.

Abstract

Actinobacteria are a group of filamentous bacteria, mainly inhabit the soil. They are known for producing a wide variety of bioactive molecules, especially antibiotics. In this context that our research work focused. A total of 99 isolates were recovered from a semi-arid soil, collected from; rhizospheric associated soil (Khenchela), mountain soil (Mount chéla region, Khenchela) and Sebkhia soil (Oum El bouaghi). Three strains (SF10, SFKH4 and SFKH10), were selected, based on preliminary screening for antimicrobial activity. The isolates were identified as belonging to the genus *Streptomyces*, based on phenotypic and chemotaxonomic study. Phylogenetic analysis revealed that the strains SF10, SFKH4 and SFKH10 were most closely related to *Streptomyces youssoufiensis*, *Streptomyces spororaveus* and *Streptomyces coeruleorubidus* with a pairwise 16S rRNA gene sequence similarity of 99, 8, 99 % and 99%.

Ethyl acetate extracts provided by the culture of the strains on solid culture were tested for their antimicrobial activity against the test microorganisms.

The structure elucidation of the biologically active molecules, purified by different chromatographic methods, was carried out by coupling several techniques of mass spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR, ^{13}C NMR, MS, MS tandem, IR and UV-Visible). *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain produced several molecules belonging to ionophoric polyethers family, abierixin, nigericin, epinigericin, and the newly isolated grisorixin methyl ester. Moreover, only one molecule, belonging to macrotetrolides family (dinactin), was obtained from *Streptomyces coeruleorubidus* SFKH10 strain. In addition, the partial characterization of the molecules secreted by *S. spororaveus* SFKH4 strain has shown its capacity to produce a large variety of complex compounds having high molecular weight.

The presence of epimeric forms of nigericin/epinigericin and grisorixin/epigrisorixin has spurred DFT (*Density Functional Theory*) computational calculations. This analysis was able to provide the relative stability of the most favored epimers. This consideration is of general interest and can be applied to the wide class of naturally occurring polycyclic polyethers.

On the other hand, the study of the cytotoxicity of the purified and identified molecules revealed that both nigericin and grisorixin methyl ester showed to affect glioblastoma stem cells proliferation in a dose-dependent manner, with a higher activity for the more lipophilic grisorixin methyl ester (IC₅₀ values of 3.85 and 3.05 μM for VIPI and COMI human glioblastoma stem cells, respectively).

In conclusion, the present study has revealed the potential of semi-arid Algerian ecosystems as a good source for bioactive molecules-producing actinobacteria, specially *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain whose secondary metabolites profile has not been studied so far by bioguided method. The clear antiproliferative activity of grisorixin methyl ester on glioblastoma stem cells represents a promising starting point aimed to the development of new drug candidates in the treatment of glioblastoma multiforme.

Keywords: Actinobacteria, *Streptomyces*, Semi-arid soils, Antibiotics, ionophoric polyethers, Cytotoxicity.

الملخص

الأكتينوبكتيريا هي بكتيريا خيطية، تتواجد في التربة بشكل رئيسي . يعرف هذا النوع من البيكتيريا , بقدرتها على إنتاج كمية متنوعة من المركبات الفعالة خاصة المضادات الحيوية. في هذا الإطار يندرج موضوع بحثنا

قمنا بعزل 99 أكتينوبكتيريا من عينات من تربة جزائرية شبه جافة قليلة الاستغلال : تربة الريزوسفير (Rhizosphère) (ولاية خنشلة) , تربة جبلية (جبل شيليا, ولاية خنشلة) وتربة السبخة (ولاية ام البواقي) .

سمح الفحص الأولي المعتمد على نتائج التضاد بالانتقاء ثلاث عزلات عالية النشاط (SF10 ، SFKH4 ، SFKH10) . اعتمادا على دراسة الصفات المورفولوجية، البيوكيميائية والفيزيولوجية، تم تصنيف الثلاث عزلات إلى الجنس *Streptomyces* . بين تحليل الحمض النووي للعزلات SF10، SFKH4، SFKH10 وتصنيفها على التوالي إلى النوع *S. youssoufiensis.*، *S. spororaveus* ، *S. coeruleorubidus* بنسب تشابه تقدر بـ 99.8%، 99% و 99%.

تم استخلاص المركبات الفعالة المفروزة من طرف العزلات باستخدام *acétate d'éthyle* بالاعتماد على نموها في وسط زرع صلب. أقيم اختبار النشاط المضاد للميكروبات لهذه المستخلصات ضد العديد من الكائنات الدقيقة،

بعد تنقيته المركبات الفعالة عن طريق تقنيات كروماتوغرافية. ، تم إجراء التحليل التركيبي لها بالاعتماد على تقنيات طيفية، ^{13}C RMN ، 1H RMN ، MS /MS و الأشعة تحت الحمراء والأشعة فوق البنفسجية المرئية .

العديد من المركبات الفعالة. أفرزت من قبل السلالة *Streptomyces youssoufiensis* SF10 ، تنتمي مجملها إلى عائلة *grisoxine méthyle* الجديد المركب *épinigéricine* ، *nigéricine* ، *abierixine* : *polyéthers ionophores ester* في المقابل، تمكنا من تحديد بنية مركب واحد فقط من سلالة *S. coeruleorubidus* SFKH10 ; و الذي ينتمي لعائلة *(Dinactine) macrotétrolide*.

بينت الدراسة الأولية للجزيئات المفروزة من قبل سلالة *S. spororaveus* SFKH4 ثراء هذه الأخيرة لمركبات معقدة ذات وزن جزيئي عالي

تواجد أشكال متماكبات *nigéricine/épinigéricine* و *grisoxine/épinigéricine*، استوجب علينا إجراء نظرية دالة الكثافة (DFT)، وعليه تم تحديد المتماكبات المستقرة نسبيا. النتائج المقدمة يمكن تطبيقها على عدد كبير من *polyéthers ionophores polycyliques*

و من جهة اخرى، كشفت دراسة السمية الخلوية لكل من *nigéricine* و *grisoxine méthyl ester* تأثيرهما على تكاثر الخلايا الجذعية بطريقة تناسبية مع الجرعة مع نشاط عالي ملموس حيث ان IC_{50} تقدر بـ 3.85 و 3.05 ميكرومول للخلايا الجذعية $VIPI$ و $COMI$ ، على التوالي

في الختام ، كشفت هذه الدراسة عن إمكانات الاوساط الإيكولوجية الجزائرية الشبه جافة احتوائها على سلالات الأكتينوبكتيريا المنتجة للمركبات الفعالة ، ولا سيما سلالة *Streptomyces youssoufiensis* SF10 حيث تعتبر دراسة مركبات هذه الاخيرة الاولى من نوعها بطريقة *Bioguidé* . تمثل السمية العالية المسجلة للمركب الجديد *grisoxine méthyle ester* نقطة بداية لتطوير دواء جديد لعلاج سرطان *glioblastome multiforme*.

الكلمات المفتاحية : الأكتينوبكتيريا. ، *Streptomyces* ، ترب شبه جافة .، المضادات الحيوية، *polyéthers ionophores* ، التسمم الخلوي.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les actinobactéries colonisent une large variété d'habitats naturels et sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Cependant, le sol représente l'habitat le plus colonisé par la majorité des actinobactéries et sert de réservoir pour leurs métabolites.

Les *Streptomyces* sont parmi les plus nombreux et les plus polyvalents microorganismes du sol. Ce groupe de bactéries est, depuis longtemps, associé de façon directe dans de multiples rôles dans les industries grâce à la production d'une grande diversité de métabolites secondaires. En réponse à la pression de sélection, les espèces du genre *Streptomyces* ont su s'adapter et mettre en place des stratégies reproductives par la formation de spores en passant par un programme de différenciation morphologique aboutissant à une différenciation métabolique qui se traduit par le passage de métabolisme primaire au métabolisme secondaire (Ou *et al.*, 2008). Au moins 7000 différents métabolites secondaires ont été découverts chez les isolats de *Streptomyces* dont beaucoup ont trouvé des applications en médecine humaine, vétérinaire, et en agriculture (Berdy, 2005, Thomas *et al.*, 2015). La majorité des antibiotiques de type polyéthers sont produits par les actinobactéries du sol appartenant au genre *Streptomyces* (Andrew *et al.*, 2009) et sont souvent associés en structures complexes généralement de haut poids moléculaire.

Au cours du 20^{ème} siècle, les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses. Cependant, leur utilisation massive et répétée a conduit à l'apparition de bactéries résistantes. Ces résistances sont devenues préoccupantes et conduisent à la mise en place de diverses stratégies pour éviter les situations d'impasses thérapeutiques. Plusieurs travaux publiés ont signalé l'apparition de nouvelles souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques (Baron *et al.*, 2018).

Le besoin de nouvelles molécules incite, aujourd'hui, les chercheurs à s'orienter vers la découverte de nouvelles souches produisant, éventuellement, de nouvelles molécules dotées de mécanismes d'action originaux. Cependant, dans certains cas une nouvelle souche peut produire un antibiotique connu. C'est le cas par exemple de la nouvelle espèce de *Saccharothrix* sp. PAL54 productrice de l'antibiotique chloramphénicol (Aouiche *et al.*, 2012).

À l'origine de deux tiers de nos antibiotiques, les *Streptomyces* ont su se rendre indispensables à l'homme et les polyéthers des *Streptomyces* sont connus pour être des

molécules ayant des activités antifongique, antiparasitaire et même des activités contre différents types de cancer (Lowicki *et al.*, 2013; Yakisich *et al.*, 2017). Ce dernier représente également une cause importante de mortalité à travers le monde. Selon l'organisation mondiale de la santé, le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde, avec 6,7 millions de décès en 2008 (environ 13% de tous les décès). Les projections sont même plus inquiétantes car les décès dus au cancer devraient atteindre plus de 13,1 millions en 2030 (Huczynski, *et al.*, 2012).

La découverte de nouvelles structures de polyéthers s'avère être une des stratégies intéressantes dans le but d'obtenir de nouvelles molécules à potentiel médical. Pour ce faire, les chercheurs orientent leurs études sur les modifications chimiques des produits naturels ou bien le screening de souches nouvellement isolées et identifiées (Djinni *et al.*, 2013).

L'analyse chimique des biomolécules fait preuve de beaucoup d'innovations. Un large panel de méthodes est disponible pour analyser les antibiotiques (Peng *et al.*, 2011 ; Eduardo *et al.*, 2014) dans des échantillons biologiques qui se complètent les unes et les autres ce qui permet de proposer des structures de façon moins spéculative.

De nombreuses recherches consacrées à la microbiologie de sols des régions arides et semi arides. Ces sols, bien que soumis à un climat aride, se sont révélés relativement riches en actinobactéries. (Boudemagh *et al.*, 2005; Boughachiche *et al.*, 2005; Aouar *et al.*, 2012). Cependant, à notre connaissance, aucune recherche n'a porté sur l'étude structurale des métabolites provenant d'actinobactéries isolées des sols semi-arides de l'est algérien. De ce faite, nous avons choisi cet écosystème pour mener notre étude, dont les objectifs se focalisent principalement sur :

- Le criblage de souches d'actinobactéries, isolées à partir des échantillons de sols prélevés de différents sites, potentiellement productrices de substances antimicrobiennes et les souches sélectionnées vont être caractérisées ;
- L'extraction, la séparation, la purification et la détermination de la structure des molécules bioactives par des techniques chromatographiques et spectroscopiques ;
- Etude de l'activité antitumorale de deux molécules majeures, provenant de la souche d'actinobacétrie, testées sur deux types de cellules de glioblastome multiforme.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

.

Le genre *Streptomyces*

1.1. Généralités

Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies stricts, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à la famille de *Streptomycetaceae* de l'ordre des *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Ils possèdent un métabolisme oxydatif et un taux G+C% compris entre 70-73%. Les *Streptomyces* sont donc des organismes procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse (mycélium de substrat et mycélium aérien).

Ils sont ubiquitaires du sol et peuvent, également, se retrouver dans certains écosystèmes extrêmes comme les sources thermales (Xu *et al.*, 1998) et les sédiments marins de l'antarctique (Ivanova *et al.*, 2001). Plus de 600 espèces de *Streptomyces* ont été isolées et identifiées (Labda *et al.*, 2012).

Les membres de ce genre ont une paroi de type I caractérisée par la présence de l'acide LL-diaminopimélique (LL-DAP) et de glycine et l'absence de sucres caractéristiques (Zhao *et al.*, 2009). La paroi cellulaire de *Streptomyces* peut inclure d'autres polymères comme l'acide teichuronique et l'acide teichulosonique. Récemment, il a été démontré la présence d'un inhabituel hétéropolymère, avec des unités de diglycosyl au niveau de la paroi de l'espèce *S. coelicolor* M145 (Alexander *et al.*, 2012).

Le mycélium aérien forme à sa maturité des chaînes de spores non mobiles dans un fin fourreau fibreux (figure 1). Les conidies (trois à plusieurs) de chaque chaîne sont souvent pigmentées et peuvent être lisses, velues ou épineuses.

Les espèces du genre *Streptomyces* se distinguent par rapport aux autres genres de l'ordre des *Actinomycetales* par la couleur du mycélium aérien et végétatif, la disposition des spores, les caractères de surface de spores, l'utilisation des glucides, la production de la mélanine, la réduction de nitrate et l'hydrolyse de l'urée et de l'acide hippurique.

La majorité des espèces de *Streptomyces* sont saprophytes non pathogènes, il n'en reste pas moins que certaines espèces ce sont avérées être pathogènes de l'homme. C'est le cas de l'espèce *S. somaliensis*. D'autres espèces sont phytopathogènes et les plus cités sont : *S. scabies*, *S. caviscabies*, *S. acidiscabies* et *S. reticulosacbie* qui provoquent la gale commune de la pomme de terre (Leiminger *et al.*, 2013).

Les *Streptomyces* sont un réservoir de biomolécules qui manifestent à faibles concentrations des activités biologiques de nature principalement antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antivirale ou antiparasitaire.



Figure 1 : cliché de microscopie électronique à balayage illustrant le genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1 μm (Flardh *et al.*, 2009).

1.2. Cycle de développement de *Streptomyces*

Une des caractéristiques du genre *Streptomyces* est le développement multicellulaire complexe, dans lequel les spores germent et forment des hyphes, avec un mycélium aérien multi-nucléaire qui forme des septums à intervalles réguliers, créant ainsi une chaîne de spores uni-nucléaires (Ohnishi *et al.*, 2008). Le cycle de développement traditionnel du genre *Streptomyces* sur milieu solide, décrit deux différentes structures mycéliennes : mycélium de substrat (végétatif) et un mycélium aérien (reproduction) (Kieser *et al.*, 2000).

Sur milieu solide, la croissance de *Streptomyces* commencera par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium de substrat dit aussi primaire formé d'hyphes non septées et plurinucléés. Ce mycélium ramifié est incrusté dans le milieu solide (Juan *et al.*, 2011). Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire. En effet, ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se spiralisent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uni-nuclées (Flardh *et al.*, 2009) (figure 2).

Les spores sont des agents de résistance et surtout de dissémination, réglant, ainsi, le problème de l'immobilité du mycélium de substrat (Flardh *et al.*, 2009). Les conidies peuvent,

suivant les espèces, être produites en courtes ou longues chainettes qui peuvent être ramifiées ou non, droites ou en spirales. Elles contiennent la plupart des éléments du mycélium de substrat (primaire). Les spores contiennent des quantités plus importantes de potassium, de calcium et de manganèse que dans le mycélium de substrat et englobent souvent des pigments et des composés aromatiques ce qui augmente leur capacité à survivre dans des environnements hostiles (Chater *et al.*, 2006). Leur contenu en tréhalose aurait, aussi, un rôle dans la dormance et la résistance des spores (Mc Bride et Ensign, 1986).

Par ailleurs, la plupart des procédés industriels de la production des métabolites secondaires sont effectués avec des cultures liquides (Angel *et al.*, 2008). Les *Streptomyces* généralement ne sporulent pas dans ces conditions (Rueda *et al.*, 2001). Quatre types morphologiques de la croissance du mycélium se distinguent dans les cultures submergées : pellets (masses compactes de 950 µm de diamètre), des touffes (masses moins compactes de 600 µm de diamètre), hyphes ramifiées et non ramifiées (Denser *et al.*, 2002). Certaines de ces structures se développent sous forme d'un biofilm constitué de polymères extracellulaires collants et des substrats insolubles (Kim *et al.*, 2004).

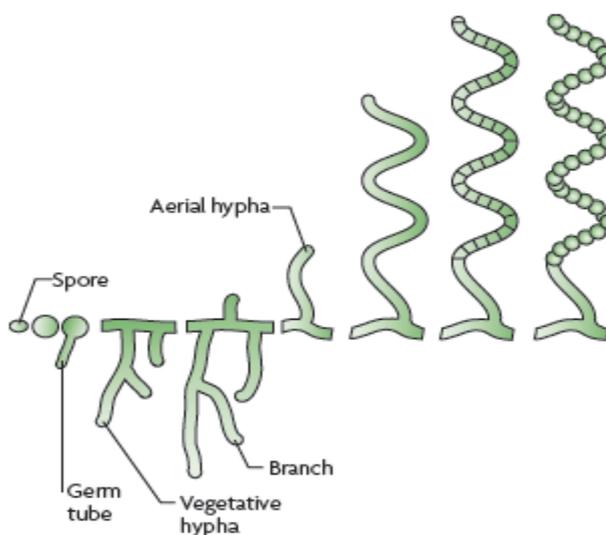
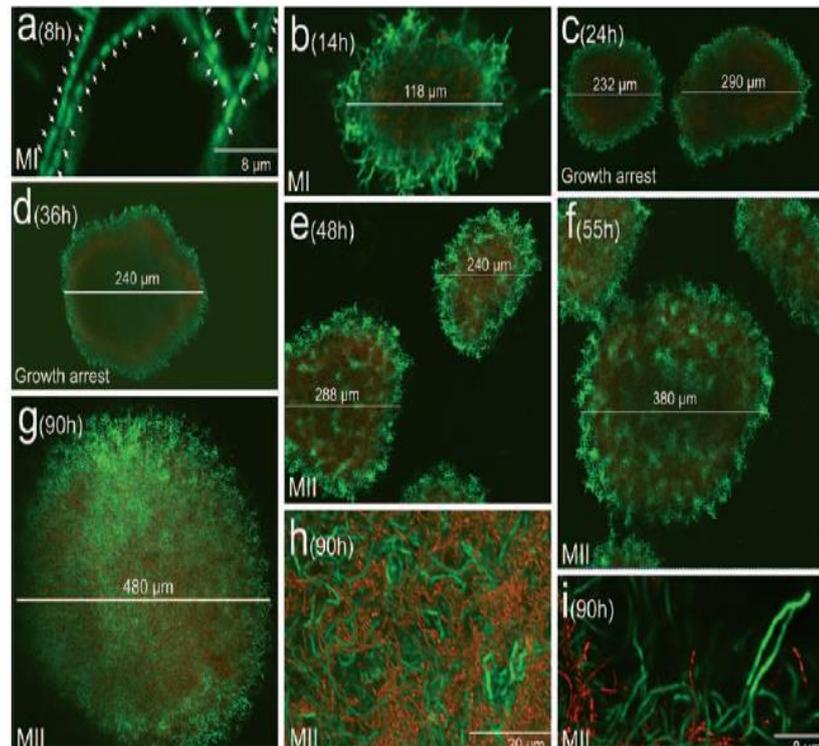


Figure 2 : cycle de développement de *Streptomyces* dans un milieu solide (Flardh *et al.*, 2009).

D'autre part, Angel *et al.* (2008), ont montré une nouvelle fonctionnalité de développement de *Streptomyces coelicolor* A3 cultivé en milieu liquide. Cette souche développe un modèle de croissance analogue à celui décrit pour les cultures en surface (en

milieu solide). Les spores germent en un mycélium compartimenté (mycélium primaire). Ces jeunes hyphes cloisonnés commencent à former des pastilles qui se développent selon un motif radial (figure 3).



Mycélium multi
nucléaire

Mycélium
primaire

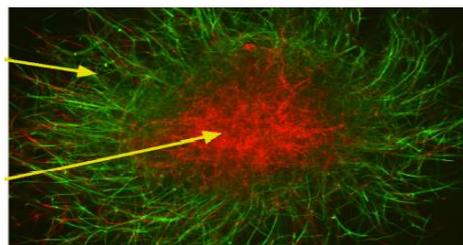


Figure 3: analyse par un microscope confocal à balayage laser (CLSM) du cycle de développement de *S. coelicolor* A3(2) dans un milieu submergé d'après Angel *et al.* (2008).

1.3. Génétique de *Streptomyces*

1.3.1. Plasticité du génome de *Streptomyces*

Les *Streptomyces* présentent des caractéristiques génomiques originales chez les bactéries avec un ADN chromosomique linéaire de taille importante (8,7Mbp à 11,9 Mbp) (Zhou *et al.*, 2012). Aux extrémités du chromosome se trouvent des séquences inversées répétées (appelées TIR pour Terminal Inverted Repeat) de taille variable selon les espèces de

Streptomyces. Ces TIR sont impliqués dans le processus de réplication de l'ADN de la bactérie.

Récemment deux séquences du génome de 6,4Mb et de 6,8Mb ont été déterminées et publiées, respectivement, pour la souche *S. violaceusniger* SP6 (Chen *et al.*, 2013) et la souche *S. albus* J1074 (Zaburannyi *et al.*, 2014). Ces deux dernières espèces possèdent le plus petit génome parmi toute les *Streptomyces*. En fait, ce record est détenu par la souche *S. somaliensis* DSM 40738, une souche pathogène de l'homme (Kirby *et al.*, 2012). L'assemblage de son génome était de 5,18 Mbp de longueur (Harrison *et al.*, 2014). En effet, l'évolution de la pathogénèse de cette espèce semble associée à une réduction du génome.

Un nombre important de génomes de *Streptomyces* ont été séquencés et assemblés entièrement. La variabilité génétique observée chez les espèces de *Streptomyces* est étroitement liée aux niches écologiques des souches. Les organismes vivants dans des habitats complexes et changeants présentent un génome assez grand. Par exemple, *S. scabies* (10,148 Mb), bactérie vivante dans le sol possède le plus grand génome séquencé (Alexandre, 2007). En revanche, les bactéries vivantes dans une niche stable possèdent un génome beaucoup plus réduit.

S. coelicolor est l'espèce de *Streptomyces* la plus étudié depuis 1996 jusqu' à maintenant. Le génome de cette souche présente 14 régions contenant des gènes pour la production des antibiotiques, gènes pour la résistance aux métaux lourds (Bentley, 2002), des gènes codant pour un grand nombre de protéines sécrétées (819), dont 60 protéases, 13 chitinases/chitosanases, huit cellulases/endoglucanases, trois amylases, et deux pectolyases (Rudi *et al.*, 2012). Egalement, *S. gancidicus* BKS souche 13-15 dont le génome contient sept gènes mappés sur la voie de biosynthèse de la streptomycine (Kumar *et al.*, 2013). Cependant, le génome de *S. leeuwenhoekii* contient 35 gènes codant pour la biosynthèse de métabolites bien spécifiques, dont la plupart sont encore non identifiés (Juan Pablo, 2015). Le génome de *S. ambofaciens* DSM 40697 est constitué d'un seul réplicon linéaire de 8,137 Mpb (Choulet *et al.*, 2006) avec des séquences inversées répétées de 212 655 paires de bases (Thibessard *et al.*, 2016). Cette souche montre des traits génomiques communs avec des souches apparentées comme *S. ambofaciens* ATCC 23877 (Figure 4) (Thibessard *et al.*, 2015).

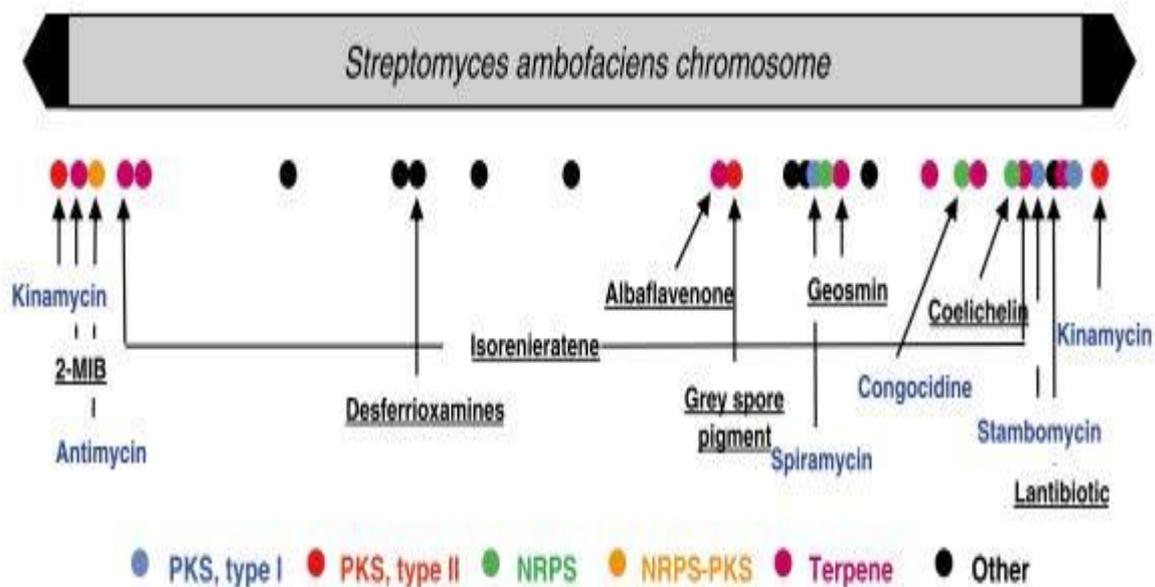


Figure 4: représentation schématique du chromosome linéaire de *S. ambofaciens* ATCC23877 (Aigle *et al.*, 2014).

1.3.2. Instabilité du génome de *Streptomyces*

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont caractérisées par une instabilité génétique très élevée (fréquences supérieures à 0,01 par cycle de sporulation) (Demuyter *et al.*, 1988; Leblond *et al.*, 1989). En effet, l'instabilité affecte préférentiellement des caractères du métabolisme secondaire, de la différenciation et de l'expression en phase tardive.

La linéarité du chromosome de *Streptomyces* représente un des exemples le plus spectaculaire de l'instabilité génétique chez les procaryotes (Volf *et al.*, 2000). Cette linéarité caractérisée par des répétitions terminales inversées (TIRS) et une protéine associée de façon covalente à l'extrémité 5' (Bentley *et al.*, 2002). Ce chromosome est intrinsèquement instable, et souvent subit des réarrangements chromosomiques qui se traduisent par une mutation spontanée au niveau des extrémités (Volf *et al.*, 1998). En effet, pour une moyenne, la taille du chromosome est d'environ 8 Mb, cela signifie que les délétions peuvent retirer environ 2 Mb d'ADN (Volf *et al.*, 2000).

Plusieurs facteurs comme l'inactivation du gène *recA*, l'exposition aux mutagènes, le choc thermique au cours de la croissance peuvent influencer la fréquence de l'instabilité génétique chez les *Streptomyces* (Volf *et al.*, 1997). En effet, l'instabilité génétique a été bien étudiée par de nombreux auteurs et sur plusieurs souches de *Streptomyces*, *S. lividans*, *S.*

antibioticus, *S. glaucescens* et *S. avermitilis* (Birch *et al.*, 1991 ; Redenbach *et al.*, 1993 ; Yu *et al.*, 1993 ; Wei *et al.*, 2010), respectivement.

1.4. Le genre *Streptomyces* du sol forestier

Le genre *Streptomyces* est le principal habitant du sol, atteignant jusqu'à 90% des actinobactéries isolés à partir des échantillons de sol (Mobolaji *et al.*, 2013). En fait, l'odeur de terre humide est en grande partie due à la production de substances volatiles, telles que la géosmine, par les *Streptomycètes*.

Ces micro-organismes jouent un rôle majeur dans la minéralisation. Ils sont très souples au niveau nutritionnel et ils peuvent dégrader, en aérobiose, des substances assez complexes telles que la pectine, la lignine, la chitine, la kératine, le latex et des composés aromatiques.

L'écosystème du sol forestier est considéré comme un des importants habitats que colonise le genre *Streptomyces*. Cet environnement riche et dynamique assure des fonctions essentielles, complexes et interactives au sein de l'environnement depuis des millions d'années. Cette dernière décennie un nombre important de souches de *Streptomyces* ont été isolées à partir de sols forestiers, telles que: *S. gilvigriseus* sp.nov (Ser *et al.*, 2015), *S. kansasensis* (Lirong *et al.*, 2015), *S. actinomycinicus* sp.nov (Tanasupawat *et al.*, 2016) et *S. humi* sp. nov. (Nurullhudda *et al.*, 2016).

Au niveau du sol forestier, les *Streptomyces* sont présents dans les différentes niches écologiques : la rhizosphère des plantes, la mycorrhizosphère ou encore la minéralosphère. Dans ces niches, les *Streptomyces* interagissent avec de nombreux autres genres bactériens (Poulsen *et al.*, 2011), différents champignons symbiotiques, pathogènes, saprophytes (Zhang *et al.*, 2013) et peuvent également interagir avec une population d'insectes (Liao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Les espèces du genre *Streptomyces* peuvent être en interaction avec les plantes et plus particulièrement avec leurs racines. Á ce niveau, le nombre de *Streptomyces* constaté est important. L'interface entre les racines et le sol où la plupart de ces interactions ont lieu est nommé rhizosphère (Philippot *et al.*, 2013).

En effet, les racines des plantes permettent l'ancrage de la plante à l'intérieur du sol et la médiation de nombreuses interactions avec les organismes du sol. Les exsudats racinaires

des plantes stimulent la croissance des *Streptomyces* au niveau de la rhizosphère. Ces derniers peuvent moduler la défense des plantes face à des phytopathogènes en stimulant les mécanismes de défense (Trejo-Estrada *et al.*, 1993). En effet, la production d'oxydants par les *Streptomyces* permettrait d'activer les défenses de plantes. Ce qui représente un support supplémentaire afin de protéger les plantes des organismes pathogènes (Kinkel *et al.*, 2012).

Au niveau du sol forestier où le bois représente la source de carbone majeure, les espèces du genre *Streptomyces* représentent un réservoir pour des enzymes intervenant dans le processus de la décomposition. Quelques isolats de *Streptomyces* dégradent les polysaccharides qui constituent la litière comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignocellulose. La litière est formée des branches et de feuilles mortes, de cadavres d'animaux, et de déchets d'êtres vivants. Ces éléments vont être convertis en matière organique grâce à l'action des organismes décomposeurs et particulièrement du genre *Streptomyces* (Amore *et al.*, 2012).

Après l'épandage de fumier à long terme sur le sol, la communauté microbienne cellulolytique est dominée par les *Streptomyces* (Ulrich *et al.*, 2008). Dans un mésocosme, la cellulose et la lignine augmente la densité des *Streptomyces* comparativement à une culture contenant du glucose (Schlatter *et al.*, 2009). Beaucoup de *Streptomyces* sont en mesure de croître sur de la lignocellulose, la cellulose et les hémicelluloses (Chamberlain et Crawford, 2000). Ces observations montrent l'importance potentielle des *Streptomyces* pour des éléments nutritifs présents dans un habitat forestier. Il pourrait aussi expliquer en partie pourquoi dans les sols forestiers où le bois est la source de carbone majeure, *Streptomyces* est le genre dominant parmi les genres bactériens (Montana *et al.*, 2012).

Les métabolites secondaires produits par le genre *Streptomyces* représentent également un excellent ensemble d'outils qui leur permet d'interagir avec d'autres microorganismes présents dans le sol et peuvent jouer un rôle dans la construction des communautés microbiennes. Ces métabolites peuvent être impliqués dans divers procédés comme la compétition inter-microbienne, la régulation de gènes, la communication inter-cellulaire (Davies, 2013). En effet, les métabolites secondaires des *Streptomyces* secrétés sont bénéfiques pour d'autres organismes. Ils peuvent, par leur relation symbiotique, dégrader la cellulose pour les insectes xylophages (Adams *et al.*, 2011), d'éliminer les champignons phytopathogènes (Lin *et al.*, 2012) et de promouvoir la symbiose mycorhizienne (Frey-Klett *et al.*, 2007).

1.5. *Streptomyces* et antibiotiques

Le nombre de molécules bioactives obtenu à partir d'actinobactéries ne cesse d'augmenter, mais il n'y a que quelques molécules qui peuvent aboutir à des applications. Pour augmenter les chances d'avoir de nouvelles molécules, il est, donc, nécessaire de s'assurer que la bactérie productrice est bien une nouvelle espèce et/ou ses biomolécules ne sont pas encore étudiées. La majorité des souches d'actinobactéries peuvent produire des métabolites secondaires à des concentrations variant de 0,1 à 1 mg/l.

Parmi les métabolites secondaires les plus étudiés se trouvent les molécules à activité antibiotique. D'un point de vue scientifique, un antibiotique est une substance sécrétée par un microorganisme qui est capable soit d'inhiber la croissance soit de tuer des microorganismes pathogènes.

Les *Streptomyces* offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antibactérienne. Ces molécules agissent sur les bactéries en inhibant la synthèse de leur paroi, de leur matériel génétique (ADN ou ARN), de protéines qui leur sont essentielles, ou encore en bloquant certaines voies de leur métabolisme. Pour cela, ils se fixent sur des cibles spécifiques (figure 5).

Les antibiotiques sont généralement produits au cours de l'idiophase et sont très diversifiés au niveau de leur structure chimique. Cependant, certains travaux ont montré que la production des antibiotiques peut débuter durant la phase exponentielle (Zitouni *et al.*, 2004).

Un nombre important de nouveaux antibiotiques de nature chimique très diversifiée a été découvert récemment (Laura *et al.*, 2011). À titre d'exemples, nous citerons, la caboxamycine de la famille de benzoxazole, sécrétée par la souche *Streptomyces* sp. NTK 937 isolée à partir des sédiments marins (Claudia *et al.*, 2009), la bezerramycine A-C douée d'activité antiproliférative est sécrétée par une souche de *S. griseus* (Patrícia *et al.*, 2010) et la quinomycine G, analogue de l'échinomycine, sécrétée par *Streptomyces* sp. LS298 isolée à partir de l'éponge marine *Gelliodes carnosus*. Cet antibiotique a montré une activité contre *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, et *E. faecalis* (Xin *et al.*, 2015).

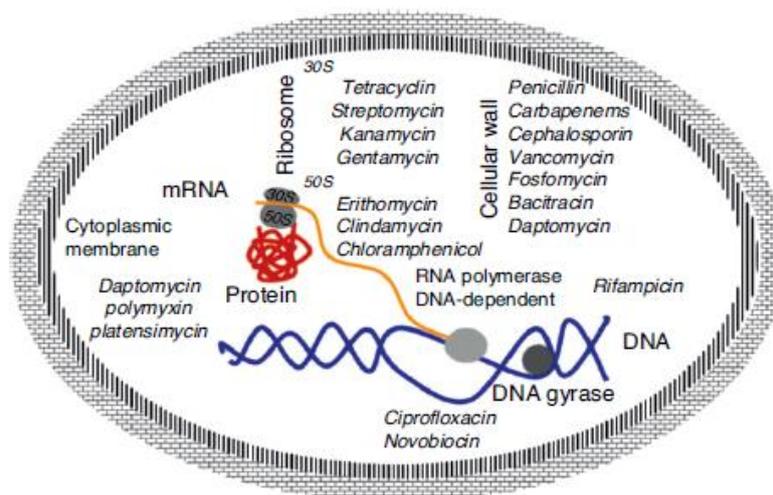


Figure 5 : mécanisme d'action des antibiotiques (Rudi Emerson *et al.*, 2012).

Plusieurs travaux ont été menés pour la découverte de nouveaux antibiotiques et l'amélioration de la surproduction en jouant sur les conditions de milieu de culture (source de carbone, source d'azote, pH, température, etc.) (figure 6C) et le type de fermentation (solide ou submergé). Récemment, la co-culture ou fermentation mixte a été reconnue comme une approche remarquablement efficace pour la découverte de produits naturels biologiquement actifs (figure 6F). La co-cultivation de *Streptomyces peuceletii* ATCC 29050 avec *Aspergillus fumigatus* a abouti à la biosynthèse de nouveaux métabolites, tel que xanthocilline-formyl (Isaka *et al.*, 2007) (figure 6F). La co-cultivation de *S. coelicolor*, souche productrice de l'actinorhodine, avec *Myxococcus xanthus* mène à de fortes productions de l'antibiotique ainsi que l'amélioration de la formation du mycélium aérien (Perez *et al.*, 2011).

De plus, la recherche des signaux qui activent différents systèmes régulant la production d'antibiotiques (figure 6D). L'addition de certains antibiotiques ou d'hormones bactériennes à de faibles concentrations, aux milieux de culture pourrait également être une alternative stimulant la production d'antibiotiques (figure 6E) (Ramon *et al.*, 2015).

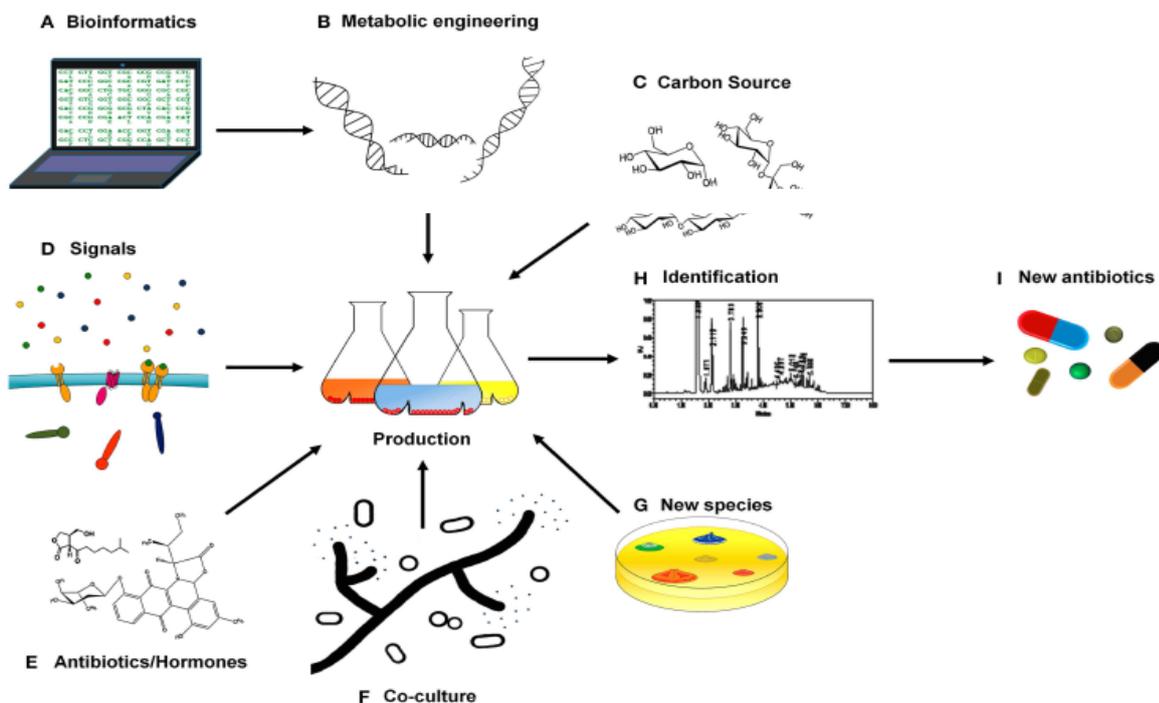


Figure 6 : nouvelles approches de la production des antibiotiques par le genre *Streptomyces* (Ramon *et al.*, 2015).

Par ailleurs, plusieurs souches de *Streptomyces* nouvellement isolées et identifiées sont en attente pour l'étude de leurs métabolites. C'est le cas par exemple de *S. zagrosensis* qui a été identifiée en 2014 par Mohammedipanah *et al.* (2014), de *S. albiflavescens* sp. Nov identifiée par Han *et al.* (2015) et de *S. hebeiensis* sp. nov identifiée par Ping *et al.* (2016).

Un grand intérêt s'est développé ces dernières décennies pour comprendre le rôle des antibiotiques vis-à-vis de la cellule productrice. Ces molécules se sont vues attribuées des rôles de signalisation et de régulation.

Plusieurs travaux ont suggéré que certains antibiotiques pourraient jouer un rôle important dans le contrôle du développement des *Streptomyces* (Chater *et al.*, 2010). La rapamycine 607, macrolide, semble être nécessaire pour la croissance aérienne et la sporulation de *S. alboniger* (McCann et Powell, 1979). La fourniture du calcium aux hyphes aériennes, semble, se faire par la rapamycine qui agit comme un chélateur de calcium (Hashimoto *et al.*, 2003). D'autres antibiotiques, notamment la germicidine et la hypnosine, peuvent agir comme des inhibiteurs de la germination des spores en fournissant peut-être un moyen pour empêcher la germination des spores *in situ* dans les chaînes de spores (Challis, 2008).

En outre, des études ont démontré que les antibiotiques peuvent, même, intervenir comme des molécules de signalisation entraînant des changements dans l'expression de certains gènes par des activations ou des répressions (Yim *et al.*, 2007). Ces différents inductions ont été signalés dans l'expression de gènes impliqués dans des processus biologiques essentiels, tels que la transcription, la traduction, la virulence, la formation de biofilm, la production d'exopolysaccharides et des enzymes telle que l'allosamidine qui induit, à des concentrations sub-inhibitrices, la synthèse de l'enzyme chitinase chez *S. halstedii* MF425 (Suzuki *et al.*, 2008).

2. Les polyéthers

2.1. Caractéristiques générales

Les polyéthers sont des polymères dont le squelette macromoléculaire contient des motifs de répétitions contenant le groupe éther. Ils peuvent être linéaires et polycycliques (Vilotijevic *et al.*, 2009). Les polyéthers sont une classe qui constitue avec les macrolides, la grande famille des polykétides. Ces métabolites sont connus pour être des molécules ayant des activités antifongique, antiparasitaire et antitumoral. Cependant, de nombreux métabolites polyéthers sont connus comme des toxines causant des maladies pour l'homme. La yessotoxine (YTX), provoque des symptômes semblables à ceux des phycotoxines paralysantes et sa toxicité est associée à une intoxication causant une diarrhée (Paz *et al.*, 2008).

Cette famille de polyéthers comprend trois grands groupes: polyéthers en chaînons, polyéthers dérivés du squalène et polyéthers ionophores.

2.2. Les polyéthers ionophores

2.2.1. Introduction

Les polyéthers ionophores constituent une famille de plus de 120 produits naturels structurellement apparentés (Dutton *et al.*, 1995). Ces molécules sont caractérisées par leur capacité à chélater les ions métalliques de façon sélective (figure 7) et les transporter à travers les membranes cellulaires. La majorité des polyéthers ionophores sont produits par le genre *Streptomyces* (exp. *S. hygroscopicus* et *S. violaceus*).

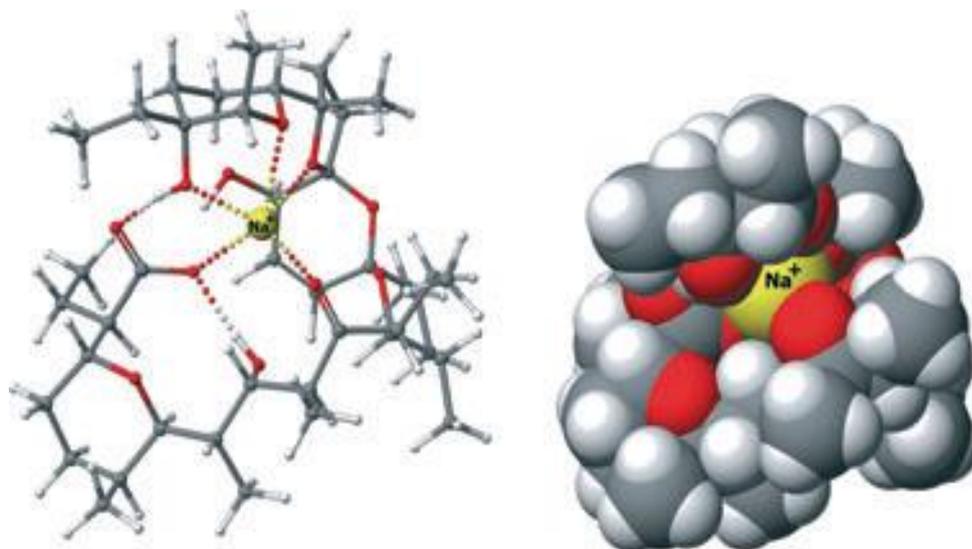


Figure 7 : structure de la salinomycine en complexe cristallin (Huczynski *et al.*, 2012).

Les polyéthers ionophores sont très actifs contre les bactéries à coloration de Gram positive. La cellule de ces bactéries est entourée par une couche complexe de peptidoglycane très poreux et perméable pour le passage des molécules lipophiles. Les ionophores lipophiles arrivant au niveau de la membrane cytoplasmique sont, rapidement, dissous à l'intérieur de la membrane cellulaire (Callaway *et al.*, 2003).

L'activité antimicrobienne des polyéthers ionophores a été, largement, étudiée notamment la monensine A et ses dérivés par (Lowicki *et al.*, 2013). Dans une autre étude, la promomycine a montré une bonne activité contre *Bacillus subtilis* avec une concentration minimale inhibitrice de 0,8 mg/ml (Amano *et al.*, 2010).

Les applications des ionophores sont étroitement liées à leur capacité à former des complexes avec des métaux et leur transport à travers les bicouches lipidiques des membranes cellulaires. Ils créent, en conséquence, un déséquilibre ionique entre la cellule et son environnement. La formation des complexes ionophores-métaux peut être neutre ou avec des cations monovalents (monensine et salinomycine) ou bien divalent (lasalocide et calcimycine) (Rutkowski et Brzezinski, 2013).

2.2.2. Structure des polyéthers ionophores

Les polyéthers ionophores sont des acides carboxyliques lipophiles qui contiennent plusieurs éthers cycliques à cinq ou six chaînons (Vilotijevic *et al.*, 2009). Ces métabolites

pourvus d'anneaux acétal sont connus pour être de simples dérivés d'acétate, de propionate et des blocs de construction de butyrate (Tiangang *et al.*, 2008). Les cycles sont soit connectés comme un système spirocétal ou ils sont séparés par au moins une simple liaison avec des noyaux condensés.

En outre, les polyéthers ionophores peuvent contenir une série d'éléments structuraux (méthoxy, halogéno, phényle) et des systèmes hétérocycliques souvent peu communs, dont certains peuvent être importants pour l'activité biologique. En général, les polyéthers présentent un groupe carboxyle à une extrémité et un ou deux groupes hydroxyle à l'autre extrémité (figure 8). En effet, c'est le groupe carboxyle terminal qui se lie par ses atomes d'oxygène aux ions métalliques et forme, ainsi, une cavité interne (Dorkov *et al.*, 2008) (figure 8).

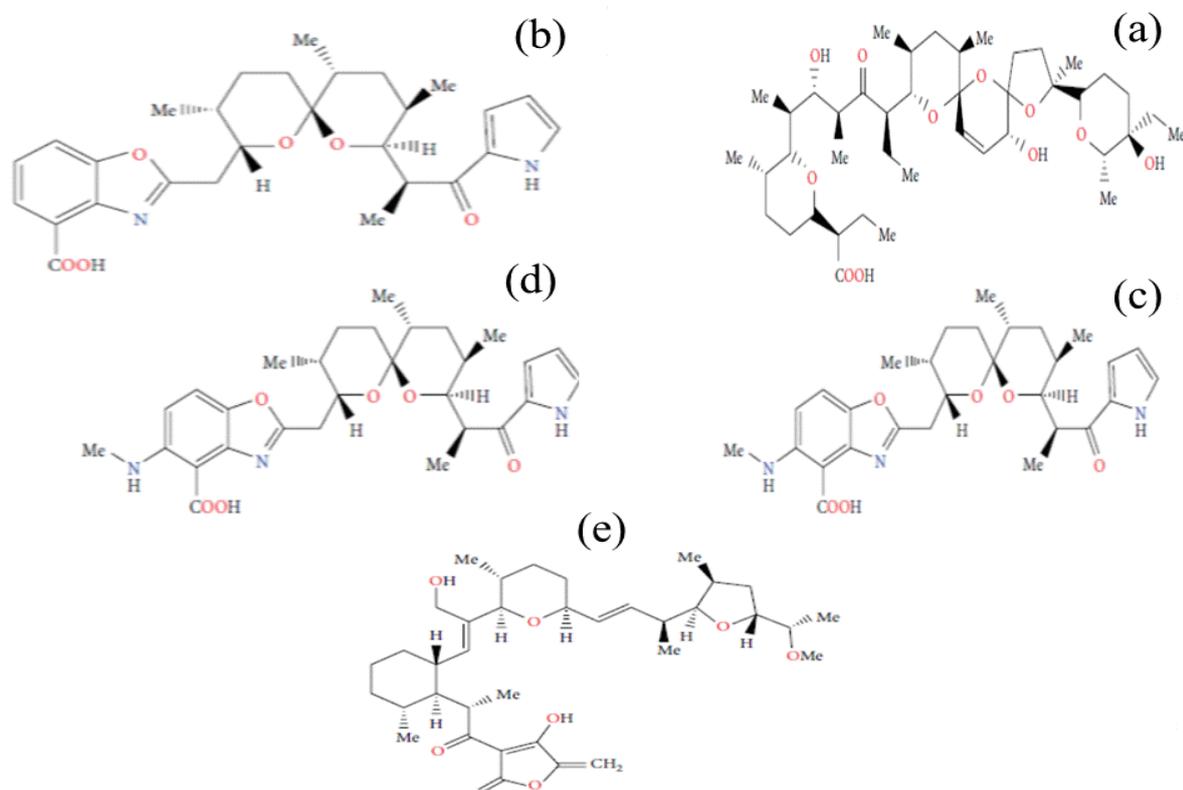


Figure 8 : exemples de la complexité et de la diversité des polyéthers ionophores (a) :salinomycine, (b) : cyzomycine, (c) : calcynomycine, (d) : lasalocide, (e) :tetronamycine (Rutkowski et Brzezinski, 2013).

La capacité des polyéthers ionophores à modifier la perméabilité des systèmes membranaires, naturels ou artificiels, leur permet de changer les gradients de concentrations de part et d'autre des membranes biologiques et ainsi d'interférer dans les processus métaboliques liés à la paroi membranaire. Ces composés (de 200 à 2000 Da) forment des complexes liposolubles avec les cations polaires, parmi lesquels K^+ , Na^+ et Ca^{2+} jouent un rôle biologique déterminant.

2.2.3. Biosynthèse des polyéthers ionophores

La diversité des structures chimiques des polyéthers ionophores résulte de voies de biosynthèse complexes. Les précurseurs chimiques et les gènes impliqués dans la biosynthèse ont été recherchés de façon approfondie pour quelques polyéthers ionophores (Harvey *et al.*, 2006 ; Harvey *et al.*, 2007 ; Wolfgang *et al.*, 2014).

En effet, les Polyéthers, provenant des microorganismes terrestres ou marins sont issus de la voie biosynthétique classique des polyketides à laquelle ils font partie et qui présentent des ressemblances frappantes avec celle des acides gras (Andrew *et al.*, 2008).

La biosynthèse de la monensine, polyéther ionophore produit par une culture de *S. cinnamomensis*, représente l'un des premiers polyéthers découverts (Haney *et al.*, 1967) et a fait l'objet de nombreuses études (figure 9).

Les polyéthers sont biosynthétisés à partir des précurseurs par des voies métaboliques très spécifiques passant par des différentes chaînes de réaction impliquant la condensation, cyclisation, méthylation, oxydation et polymérisation (Katsuki *et al.*, 1980). L'identification de l'origine des atomes de carbone de certains polyéthers, en utilisant des éléments radioactifs marqués (C_{14} et du C_{13}), a montré qu'ils ont comme précurseurs une ou plusieurs unités d'acides gras à courtes chaînes: acétate, propionate et butyrate.

De plus, des recherches ont démontré que l'assemblage des polyéthers ionophores s'effectue à partir d'une unité de démarrage ou une initiation appropriée via le malonyl-CoA, le méthylmalonyl-CoA, et parfois l'éthylmalonyl-CoA comme unités d'extension (Hutchinson, 1999). Le métabolisme du butyrate jouent un rôle important dans la fourniture de ces précurseurs d'acides dicarboxyliques (Zhang *et al.*, 1999). La variation, à la fois, de l'unité d'extension, le degré de polymérisation et la stéréochimie des étapes réductrices au

niveau de chaque chaîne permet d'obtenir une grande diversité de produits naturels (Harvey *et al.*, 2007).

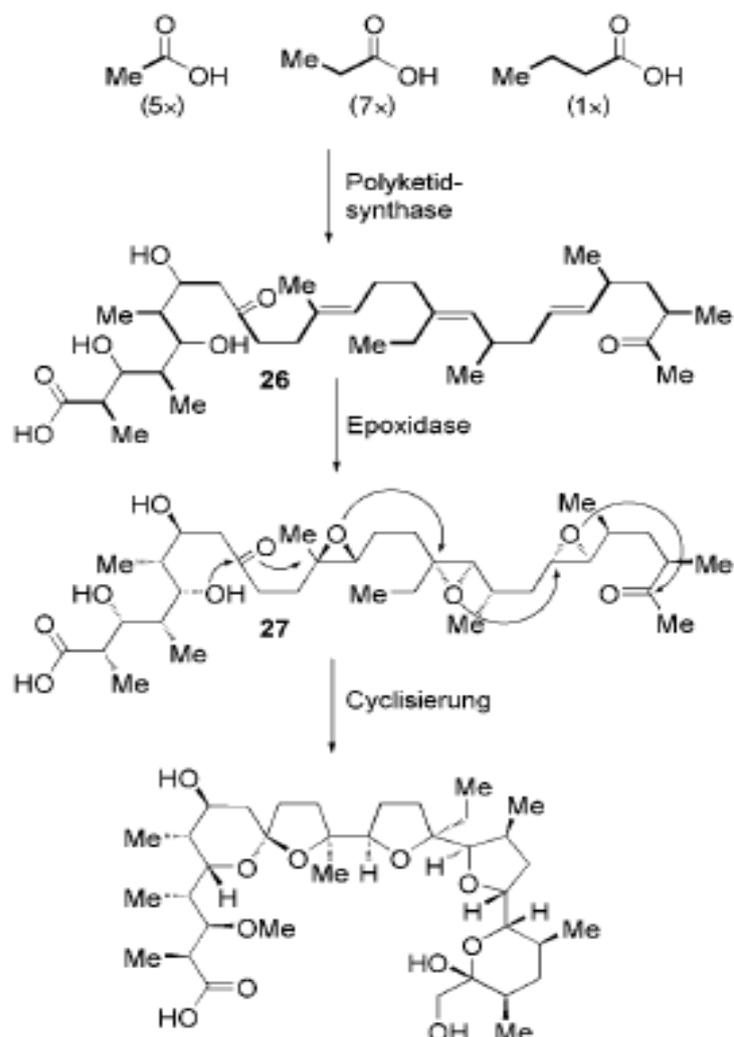


Figure 9 : hypothèse de la voie de biosynthèse de la monensine A (Vilotijevic *et al.*, 2009)

La polykétide synthase (PKS), complexe enzymatique, multifonctionnel de grande taille est présente chez de nombreux microorganismes. Cette enzyme joue un rôle important dans la catalyse de la voie de biosynthèse des polyéthers et intervient dans le processus de démarrage, d'élongation et de terminaison. Cependant, les produits intermédiaires et les enzymes impliquées dans les étapes ultérieures d'oxydation et de la cyclisation restent non déterminés (Harvey *et al.*, 2006).

Sur le plan génétique, cette enzyme se présente comme des chaînes d'assemblage protéique codée par des gènes organisés en opéron chez les bactéries (Harvey *et al.*, 2006). Elles sont composées d'un ou plusieurs domaines, permettant ainsi la sélection des blocs de

construction. L'étape d'assemblage s'organise via la condensation de simples blocs de construction, des unités acyl-CoA. Ces derniers serviront à la synthèse des polyéthers.

Du point de vue action, la Polykétide synthase est très similaire à l'enzyme Fatty Acid Synthases (FASs). Cette similarité de mécanisme est corrélée à une homologie au niveau de la séquence primaire de ces deux types de synthases qui démontre qu'elles possèdent une origine commune en termes d'évolution.

Les PKS se répartissent en trois groupes (type I, II et III) en fonction de leurs séquences, leurs structures primaires et les mécanismes catalytiques. Le type I PKS est similaire au type I synthase d'acide gras (FAS), c'est un ensemble géant de polypeptides multifonctionnels, chacun consistant en une série de domaines catalytiques : cétoynthase (KS), un groupe acyle transférase et une protéine porteuse d'acyle (ACP) (Dayu *et al.*, 2012).

La biosynthèse de certains polyéthers ionophores nécessite la présence d'un nombre important de molécules précurseurs, c'est le cas de l'indanomycine. Cet métabolite a été produit par une culture liquide de *S. antibioticus* et sa biosynthèse a été étudiée par Roege *et al.* (2009). L'acétate, le propionate, le butyrate et la L-proline sont les précurseurs de la production de ce polyéther. Le squelette carboné de l'indanomycine peut incorporer six unités de malonyl-CoA réductase, et par conséquent six unités d'acétate (figure 10).

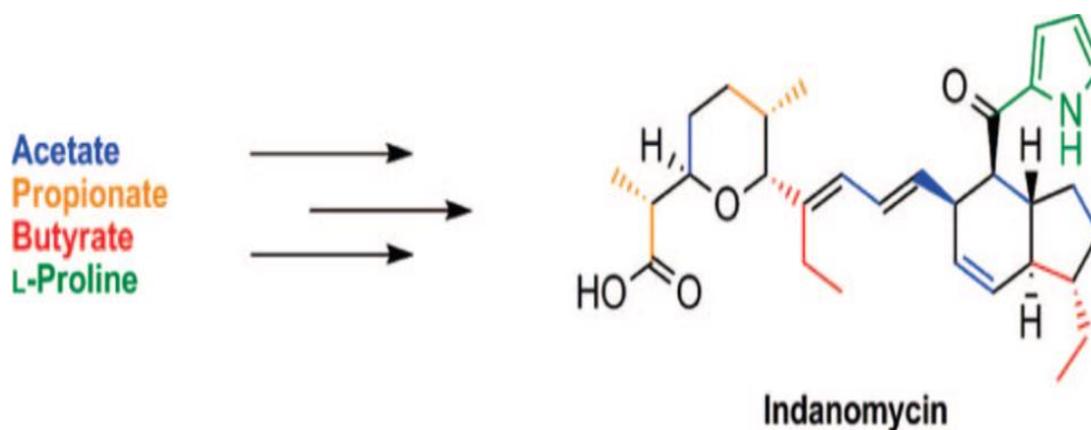


Figure 10 : les intervenants dans la voie de biosynthèse de l'indanomycine d'après Roege *et al.* (2009).

2.2.4. Propriétés biologiques

Ces métabolites secondaires ont un spectre d'activité biologique très étendu. La plupart des polyéthers ionophores possède une très forte activité antibactérienne *in vitro*, particulièrement vis-à-vis des bactéries à Gram positif. La monensine et certains de ses dérivés ont montré une activité contre les bactéries du genre *Micrococcus*, *Bacillus* et *Staphylococcus* (Dorkove *et al.*, 2008 ; Huczynski *et al.*, 2008). La narasine a présenté également une activité antifongique remarquable contre *Malassezia pachydermatis* (Wei Yee Chan *et al.*, 2018).

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré les propriétés anti-inflammatoires des polyéthers ionophores. Ces métabolites sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Soner *et al.*, 2014). L'activité antivirale a été rapportée également pour certains polyéthers, notamment pour la nigéricine dans l'inhibition de la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (Nakamura *et al.*, 1992).

Min Kyun *et al.* (2008) ont montré l'activité antimalarique d'un polyéther produit par une culture de *Streptomyces* sp. contre une souche résistante de *Plasmodium falciparum* (W2). De plus, l'activité larvicide de certains polyéthers a été rapporté contre les larves des insectes nuisibles (Yuhui *et al.*, 2002).

Au cours des dernières décennies, les polyéthers ionophores ont joué un rôle très important en tant qu'agents chimiothérapeutiques anticancéreux. Cette propriété est notée soit pour leurs formes naturelles (non modifiées) ou synthétiques (Yakisich *et al.*, 2017 ; Jiang *et al.*, 2018). En 2009, Gupta *et al.* ont rapporté l'action de la salinomycine contre les cellules souches cancéreuses et l'inhibition de leur croissance. Cette capacité était supérieure à 100 fois comparée au paclitaxel (molécule anticancéreuse utilisée en chimiothérapie.). En outre, il a été prouvé que la salinomycine est capable de tuer les cellules cancéreuses résistantes aux agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine, la cisplatine, la gemcitabine et la témozolomide (Kim *et al.*, 2012 ; Antoszczak, *et al.*, 2015). Ce même métabolite a été testé par son effet antinéoplasique destiné à bloquer la prolifération du néoplasme (Manago *et al.*, 2015). Une étude de Yoon *et al.* (2013) a montré également, la capacité de la monensine et la de narasine d'induire l'apoptose chez les cellules du glioblastome. De plus, une autre étude, a montré l'effet de la nigéricine sur la prolifération des cellules cancéreuse multirésistante (Yakisich *et al.*, 2017).

2.2.5. Mécanisme d'action des polyéthers ionophores

L'état physiologique normal de la plupart des cellules vivantes dépend de l'équilibre ionique existant au niveau intra- et extracellulaire. Cet équilibre ionique participe à l'établissement et à la modulation du potentiel électrique membranaire, à la régulation du volume cellulaire et au transport de divers ions et molécules organiques.

Les polyéthers ionophores, qui possèdent la propriété de former des complexes liposolubles, électriquement neutres, avec les cations, peuvent facilement pénétrer sous cette forme à travers la membrane cellulaire. Cette pénétration perturbe l'équilibre ionique présent de part et d'autre de la membrane, entraînant la mort de la cellule (Huczynski *et al.*, 2012). Les activités biologiques des polyéthers sont étroitement liées à cette propriété. Russell *et al.* (1987) ont montré que l'activité antibactérienne des polyéthers ionophores pourrait être due à leur action sélective sur la membrane plasmique bactérienne. Ces métabolites altèrent la membrane plasmique bactérienne en s'y incorporant et en y formant des pores, entraînant ainsi, diverses modifications cytoplasmiques.

les polyéthers ionophores, considérés également comme de bons inhibiteurs de la Glycoprotéine P (transporteur membranaire), habituellement associée à une augmentation de la résistance aux médicaments anticancéreux.

Certains polyéthers ionophores ont pour cible l'appareil de Golgi. Ces antibiotiques, notamment la monensine inhibent la croissance des cellules en bloquant le passage intracellulaire des protéines vers l'appareil de Golgi, avec aucune inhibition apparente de la synthèse de ces protéines. Cette même molécule, induit un changement du pH au sein de la cellule, conduisant ainsi à une réduction de la sécrétion et/ou le transport des produits chimiques importants pour le bon fonctionnement de la cellule (Mollenhauer *et al.*, 1990).

3. Techniques d'études des molécules antimicrobiennes

3.1. Introduction

L'évolution des technologies a permis la réalisation d'instruments très performants, apportant des possibilités nouvelles, notamment avec l'introduction des méthodes couplées et des techniques non destructives.

Au départ, compte tenu de la nature du composé à doser, nous devons faire le choix de la méthode : méthode spectroscopique, électrochimique, séparative, etc. Puis vient le choix de la technique : si, par exemple, nous avons choisi la méthode chromatographique, fera-t-on appel à la chromatographie en phase gazeuse ou à la chromatographie en phase liquide ? Mais avant de commencer l'analyse, se pose également le choix du procédé relatif au prélèvement et au traitement, préalable, à faire subir à l'échantillon.

Les échantillons se caractérisent par une très grande complexité. Plusieurs molécules peuvent être présentes, avec des masses moléculaires différentes, des natures différentes, et des concentrations variantes. En raison de cette grande hétérogénéité, ce mélange complexe ne peut être analysé en une seule fois. Il est donc nécessaire de le simplifier. Pour diminuer la complexité du mélange, plusieurs approches peuvent être utilisées et/ou combinées.

Le fractionnement, qui a pour but de simplifier un extrait brut en séparant les molécules, réduit la complexité du matériel de départ et facilite l'identification des molécules actives. Il est nécessaire d'analyser la fraction par des techniques chromatographiques couplées à des systèmes de détection afin de regrouper les fractions similaires ou de vérifier l'état de pureté des fractions actives.

En effet, les méthodes d'étude des biomolécules peuvent être rangées en deux catégories : les méthodes de séparation et de purification (Chromatographie sur colonne, HPLC, etc) et les méthodes spectrales (spectrométrie de masse, RMN, etc).

3.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide à haute performance est la plus connue. La CLHP ou sous acronyme anglais HPLC (High Performance Liquid Chromatography), un type de chromatographie qui permet de séparer des mélanges complexes avec une excellente résolution. Cette technique a majoritairement été utilisée pour l'analyse des molécules bioactives notamment les antibiotiques car elle présente de nombreux avantages (Michael *et al.*, 2003).

De part de sa large gamme d'application, sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité et la présence d'une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté. La CLHP dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes

de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

La phase mobile est généralement composée d'un mélange d'au moins deux solvants, ce qui permet d'en faire varier la polarité. Selon le type de la phase stationnaire, la CLHP peut être utilisée selon plusieurs modes de séparation en fonction des caractéristiques physico-chimiques des molécules à séparer dont le mode dit phase normale (PN), et le mode dit phase inverse (PI) (Malviya *et al.*, 2010).

En CLHP en phase normale désigné sous l'acronyme anglais NP-HPLC (NP, Normal Phase), la phase stationnaire est polaire constituée de gel de silice. Lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. (Malviya *et al.*, 2010).

En CLHP en phase inverse désigné selon l'acronyme anglais RP-HPLC (RP, Reversed Phase), elle est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C₈ et C₁₈) (Malviya *et al.*, 2010).

Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire constitué d'un mélange d'une phase aqueuse et d'un solvant miscible avec celle-ci (acétonitrile ou méthanol). RP-HPLC est la stratégie la plus communément utilisée dû à la qualité des séparations obtenues. De nombreux antibiotiques y compris les polyéthers ionophores de polarité variée peuvent être efficacement analysés par HPLC en phase inverse (Harvey *et al.*, 2007).

La colonne représente le cœur de l'appareil, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles (Mukthi, 2016). En effet, de nombreux progrès ont été effectués concernant les colonnes chromatographiques de par la volonté d'augmenter la capacité de pics et de réduire considérablement le temps des analyses. Le support des colonnes majoritairement utilisé est le gel de silice formé de grains de diamètre variant de 1,5 à quelques dizaines de micromètres. Ces grains présentent à leur surface des pores de diamètres différents (80 à 300 µm) à travers desquels la phase mobile circule (Saunier et Godin, 2013).

Afin que la composition de l'éluant programmée se rend dans la colonne chromatographique le plus rapidement possible, l'instrument est configuré avec une pompe à haute pression qui peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) (Francis *et al.*, 2004). Les pompes

équipées d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de mélange de solvants. La séparation peut être effectuée en mode isocratique lorsque la composition en solvants de la phase mobile demeure constante. Au cours de l'élution par gradient, la composition de la phase mobile varie durant l'analyse.

Dans des conditions chromatographiques données, trois méthodes d'étalonnages différents peuvent être utilisées, chacune avec ses propres avantages et ses limites. Ces méthodes entrent, également, dans l'analyse quantitative : étalon externe, étalon interne et la méthode des ajouts dosés (Standard addition method). La méthode d'étalon externe est la plus simple des trois méthodes. La précision de cette méthode dépend de la reproductibilité du volume d'injection. Pour effectuer ce procédé, il est nécessaire d'effectuer une courbe d'étalonnage à partir d'une solution standard. L'injection ultérieure du même volume de l'échantillon à dosé, permet de connaître la concentration recherchée de l'échantillon à doser.

Plusieurs types de détection sont disponibles, détecteur de type UV d'une seule longueur d'onde à la fois et le détecteur à barrette de diodes (DAD) de plusieurs longueurs d'ondes à la fois, l'évaporateur à diffusion de lumière, le détecteur d'indice de réfraction, le détecteur à ionisation de flamme (FID), etc (Mukthi, 2016). En effet, le détecteur UV-Visible et le détecteur évaporateur à diffusion de lumière représentent les principaux détecteurs, généralement, utilisés pour étudier les antibiotiques.

- **Détecteur à UV-Visible**

Le détecteur UV-Visible d'une seule longueur d'onde à la fois permet d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance ou de l'absorbance. L'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et positions des maxima d'absorption. Les groupes fonctionnels des composés organiques (cétones, amines, dérivés nitrés, etc.) responsables de l'absorption en UV/Vis sont appelés *groupements chromophores*. La sensibilité de ce type de détecteur dépend de la concentration du milieu absorbant, du trajet optique de la cellule et du coefficient d'extinction molaire des composés à analyser. Cette étude permet de détecter les composés aromatiques, qui absorbent entre 240nm et 260nm (figure 11) (Francis *et al.*, 2004).

La fonction du monochromateur est de sélectionner une longueur d'onde parmi le spectre du rayon incident. Les plus simples sont composés de filtres ne laissant passer qu'une seule longueur d'onde; il est possible d'en utiliser plusieurs afin d'obtenir différentes longueurs

d'onde. Cependant leurs possibilités sont limitées: les filtres sont peu précis dans leur sélection et ne sont utilisables que dans le domaine visible. De plus, balayer le spectre entier nécessite une multitude d'interventions (Francis *et al.*, 2004).

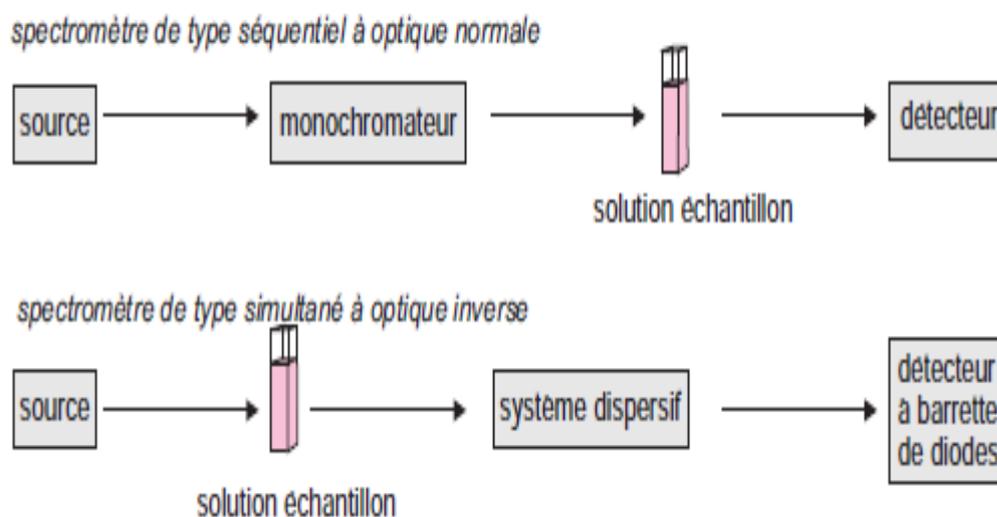


Figure 11 : instrumentation dans l'UV/Visible (Francis *et al.*, 2004).

Plusieurs appareils modernes opèrent avec une barrette de diodes de détection (DAD, *Diode Array Detector*), qui permettent de mesurer l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde simultanément (figure 12). Ce dernier permet non seulement d'obtenir un chromatogramme, mais il fournit des renseignements spectraux pouvant servir à s'assurer de l'identité des composés séparés (Francis *et al.*, 2004).

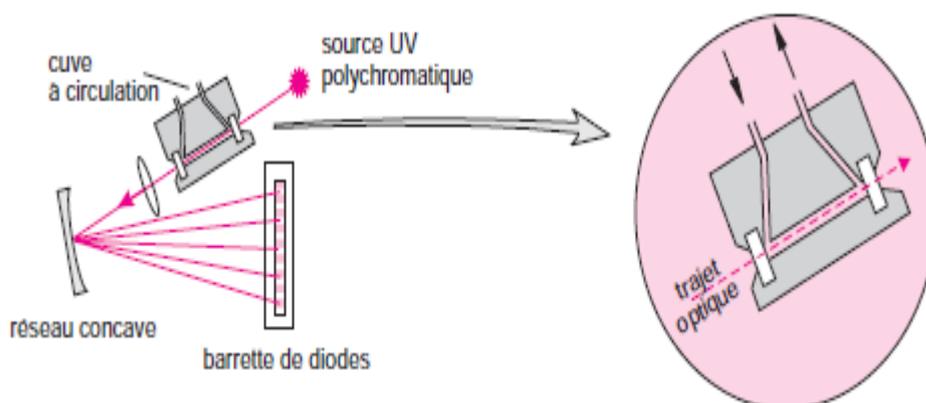


Figure 12 : principe du détecteur à barrette de diodes (Francis *et al.*, 2004).

- **L'évaporateur à diffusion de lumière** (acronyme en anglais ELSD, *Evaporative light scattering detection*)

Ce détecteur a été reporté pour la première fois par une équipe australienne en 1966 comme une alternative au détecteur conventionnel utilisé en chromatographie liquide (Lucena *et al.*, 2007). Depuis ces vingt cinq dernières années, ELSD a acquis une notoriété bien établie grâce à plusieurs études théoriques basées sur des recherches fondamentales et à de nombreuses applications développées dans différents domaines (Montesano *et al.*, 2016).

Cette technique a pour principe de la détermination de la quantité de lumière diffusée par des particules de soluté après une étape d'évaporation (Lucena *et al.*, 2007). La phase mobile passe à travers un nébuliseur où elle est mélangée avec de l'azote, puis elle est évaporée à travers un tube chauffé. Un laser va irradier les particules ainsi formées (1/10ème de μm à quelques μm) et une photodiode va détecter la lumière diffusée. Les particules diffusent la lumière dont les longueurs d'onde se situent dans le domaine du visible. La diffusion dépend du rayon des particules et de longueur d'onde du rayonnement incident (figure 13).

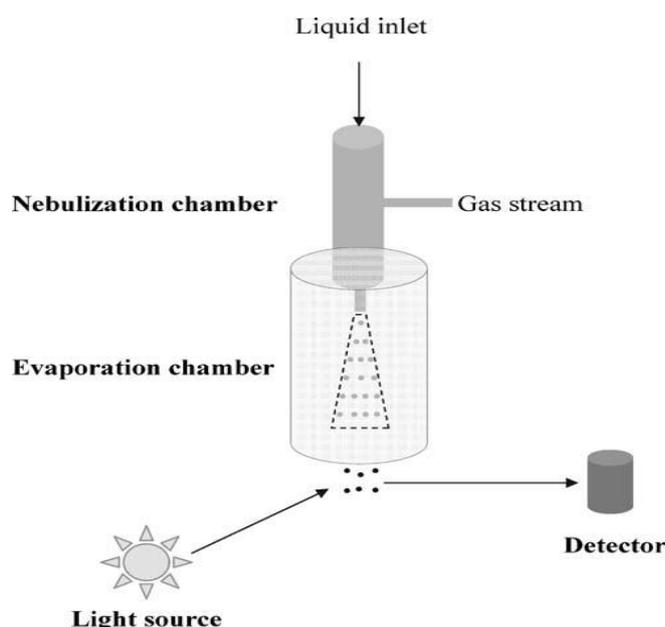


Figure 13 : schéma représentatif de détecteur évaporateur à diffusion de lumière (Lucena *et al.*, 2007).

Cette technique se différencie par rapport aux autres modes de détection par la capacité à signaler des molécules non chromophores, des molécules qui n'ont pas une absorbance en UV. Elle peut en effet détecter des composés comme les sucres (Montesano *et al.*, 2016) et certains antibiotiques (Junyi *et al.*, 2011).

La maîtrise du couplage en ligne, devient un outil précieux. Le couplage de chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS), chromatographie liquide-spectrométrie de masse tandem (acronyme anglais, LC-MS/MS), chromatographie liquide-spectroscopie infrarouge (acronyme anglais, LC-IR) et la chromatographie liquide-résonance magnétique nucléaire (acronyme anglais, LC-NMR) permettent, ainsi, d'obtenir des informations structurales sur les molécules séparées et d'évaluer leur pureté.

3.3. La spectrométrie de masse

Cette technique destructive repose sur le degré de déviation de particules chargées par un champ magnétique pour avoir les masses relatives des ions moléculaires et de leurs fragments. En effet, la spectrométrie de masse utilise la différence de rapport de masse à la charge (m/z) des atomes ou des molécules ionisées pour les séparer (Shibdas *et al.*, 2012).

Les antibiotiques ont été largement étudiés en spectrométrie de masse (Harvey *et al.*, 2007). Ces études ont permis d'établir des schémas de fragmentation de ces composés dans le but de pouvoir les identifier dans un extrait brut sans avoir à les isoler. L'un des principaux avantages de cette technique est d'apporter des informations à partir d'une quantité minimale d'échantillon (du mg au pg).

Le spectromètre fonctionne dans des conditions de pression allant de la pression atmosphérique au niveau de la source d'ionisation à un vide poussé au niveau de l'analyseur. Le vide est nécessaire pour optimiser la transmission des ions jusqu'au détecteur sans qu'ils subissent de collisions avec les molécules gazeuses (Edmond *et al.*, 2007).

Le premier renseignement apporté par un spectre de masse est la masse moléculaire et, éventuellement, la composition élémentaire de la molécule échantillon. Un spectromètre de masse peut être utilisé comme détecteur à haute sélectivité en couplage avec une chromatographie en phase vapeur ou liquide, ses applications vont de la détection de traces à l'identification des constituants d'un mélange.

L'introduction de la LC/MS dans l'analyse des extraits des antibiotiques représente une étape importante dans l'identification des produits naturels. C'est la technique de choix pour caractériser rapidement sans séparation chimique des éléments d'un mélange de composés naturels pour savoir s'ils sont connus ou non (Crevelin *et al.*, 2014).

Le fonctionnement général de la spectrométrie de masse comprend trois étapes : source d'ions, analyseur de masse et le détecteur (figure 14).

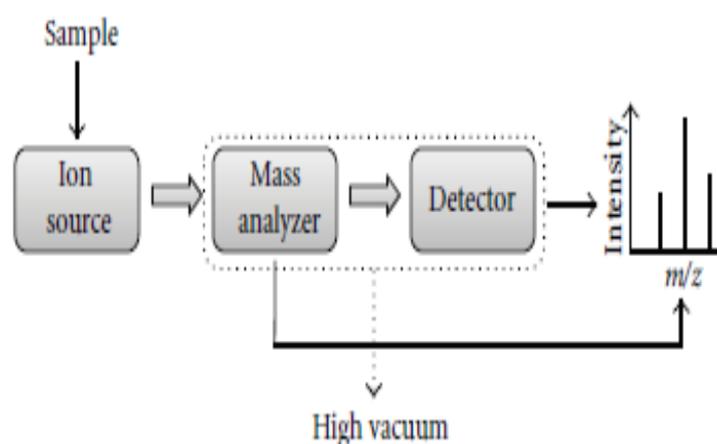


Figure 14 : configuration instrumentale d'un système de spectrométrie de masse (Shibdas *et al.*, 2012).

- **Ionisation**

Le mode d'introduction de l'échantillon dans la chambre d'ionisation dépend de l'état physique de la substance. Différents types d'ionisation existent chacune repose sur un principe physique différent. Nous donnons ici, l'électronébulisation (ESI, *électrospray ionization*), un aperçu sur le type d'ionisation le plus répandu et le plus utile pour l'étude structurale des biomolécules (figure 15) (Shibdas *et al.*, 2012). Ionisation par l'électronébulisation est une technique récente, bien adaptée à l'étude de molécules bioorganiques. Ce type d'ionisation peut être divisé en deux étapes : **la nébulisation** (la solution à analyser est dispersée en des microgouttelettes chargées), **la désolvatation** (durant le trajet des microgouttelettes, le solvant, contenant les composés, s'évapore en réduisant de plus en plus leur diamètre).

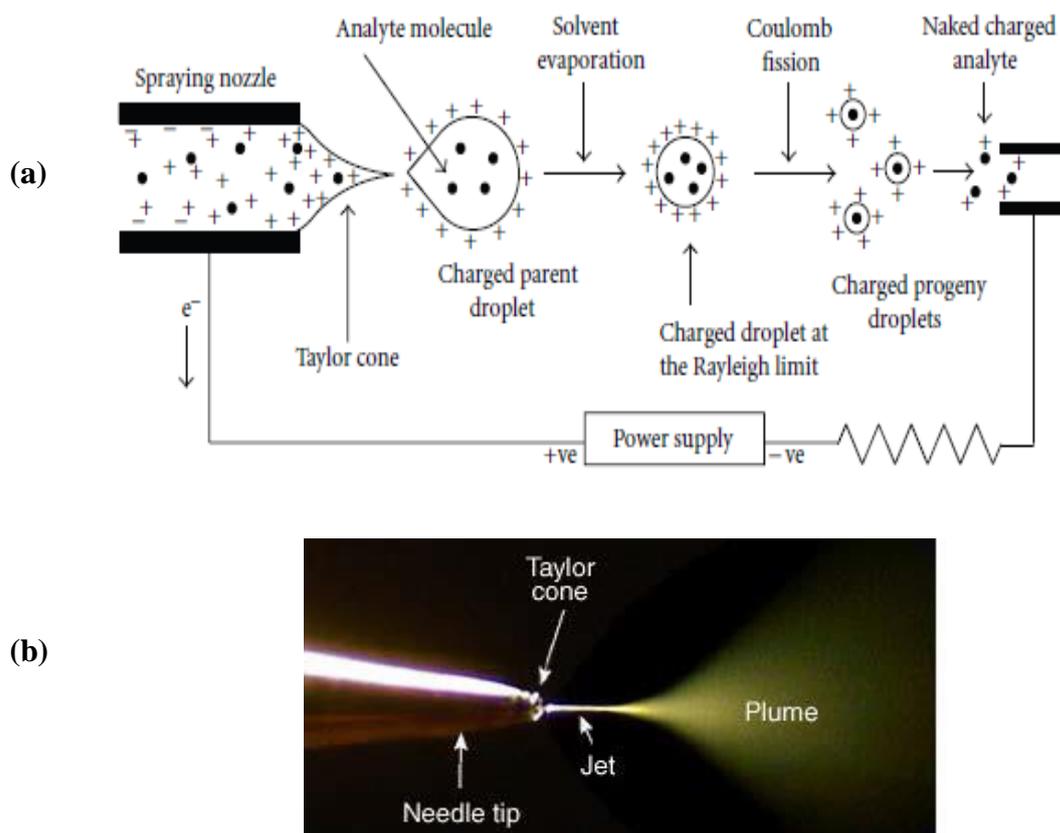


Figure 15 : principe de l'électrospray ionisation (a), formation de nébulisat (sparm) (b).

- **Les analyseurs**

Les ions formés dans la source sont dirigés vers l'analyseur. Le rôle des analyseurs est leur capacité à séparer les ions en fonction du rapport masse sur charge (m/z) (Gaskell, 2012). Plusieurs critères permettent de différencier les analyseurs, la gamme de masses détectables, la précision sur la mesure d'une masse, la sensibilité, la vitesse d'acquisition et le plus important c'est la résolution. Les mesures dites en hautes résolution sont surtout effectuées pour obtenir des masses exactes. En spectrométrie de masse, différents types d'analyseurs sont utilisés : analyseurs à temps de vol, analyseurs quadripolaires, analyseurs à trappe d'ion, etc. La trappe ionique est la plus utilisée actuellement. Elle fonctionne comme un piège à ions qui s'accumulent à l'intérieur d'une cellule de forme cylindrique sous l'effet d'un champ électrique radiofréquence (McLuckey *et al.*, 1994). L'entrée des ions s'effectue à travers d'un orifice percé dans l'une de ces électrodes (calotte supérieure) et leur sortie, au centre de l'électrode opposée (calotte inférieure). À l'intérieur de ce piège, les ions suivent une trajectoire close (March, 1997).

4. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Pour être observable par RMN, un noyau atomique doit posséder un spin nucléaire I non nul. Ce dernier représente une propriété intrinsèque des noyaux. Dans un champ magnétique, le spin du proton va s'aligner selon deux positions : parallèles et antiparallèles. Les deux positions ne sont pas équivalentes. Elles correspondent à des niveaux d'énergie différents. La résonance consiste au passage du noyau d'un état énergétique favorable A (suivant la direction de H_0) à un état énergétique défavorable B (antiparallèle à H_0) (figure 16). Placés dans un champ magnétique, les spins des protons s'alignent et deviennent sensibles à l'énergie d'une impulsion radiofréquence RF avec laquelle ils entrent en résonance (Bothwell et Griffin, 2010).

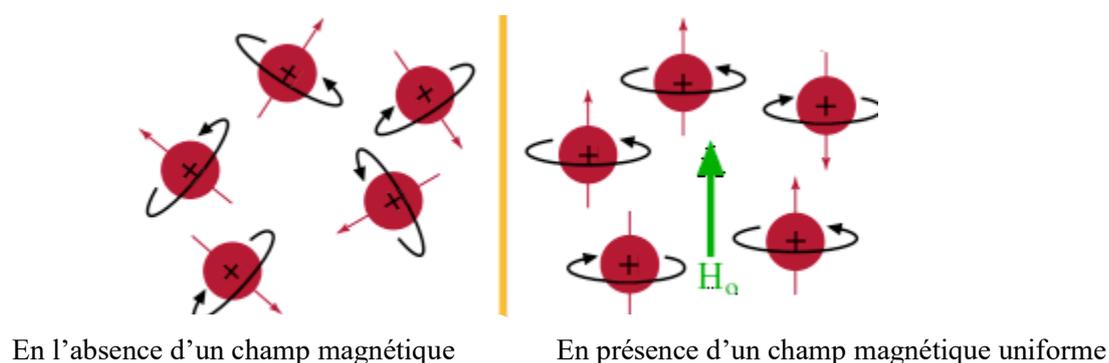


Figure 16 : orientation des protons en absence et en présence d'un champ magnétique.

La RMN est une technique spectroscopique puissante non destructive qui repose sur le magnétisme du noyau (Bothwell et Griffin, 2010). Elle est fondée sur la mesure de l'absorption de la radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique fort et uniforme (Bothwell et Griffin, 2010)

La RMN est l'une des techniques analytiques les plus puissantes disponibles pour les biologistes. De nombreuses de ses applications peuvent être comprises en termes non mathématiques. En effet, les spectromètres RMN modernes permettent à leurs utilisateurs d'acquérir et d'analyser des spectres complexes sans avoir besoin d'une compréhension physique profonde des concepts par lesquels les données sont générées. La figure 17 présente un schéma général d'une expérience RMN.

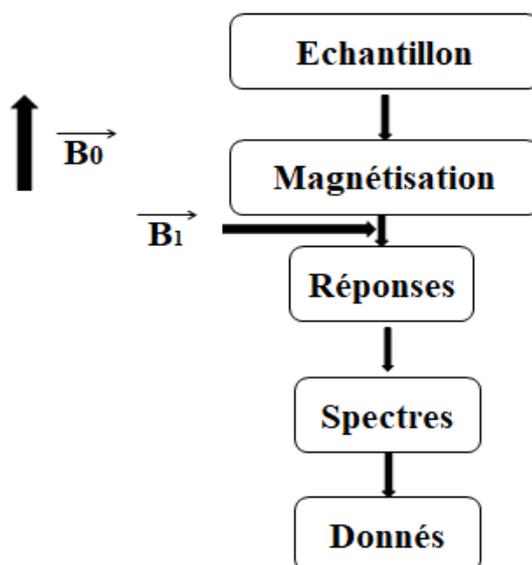


Figure 17 : représentation schématique d'une expérience RMN.

La RMN permet de déterminer la structure des produits naturels et de synthèse notamment les macromolécules (protéines, polysaccharides) et les antibiotiques. Elle permet, également, d'étudier des processus dynamiques (cinétiques et équilibres). La RMN est basée sur la propriété magnétique de certains noyaux atomiques dont le proton (H_1), le carbone C_{13} ou encore le phosphore (P_{31}). En complément des méthodes de spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, cette technique permet de préciser la formule développée, la stéréochimie, et également la conformation du composé étudié (Francis *et al.*, 2004).

Plusieurs paramètres interviennent dans la caractérisation des biomolécules :

-le déplacement chimique δ (delta) qui représente la position des différentes raies de résonance sur un spectre RMN. Ces positions varient de quelques Hertz à quelques kilos Hertz (Silverstein *et al.*, 2007).

-l'intensité d'un signal est mesurée par sa surface. La courbe d'intégration s'établit par les surfaces des signaux qui se présente sous la forme d'une série de paliers, la hauteur de chaque palier est proportionnelle au nombre de protons (H) correspondants.

-la constante de couplage représente une entité fondamentale dans la détermination structurale et conformationnelle des molécules. Cette valeur prend en considération deux éléments : Le nombre de noyaux voisins, c'est à dire les noyaux couplés au noyau observé et l'angle qui

existe entre les deux noyaux considérés. La valeur de l'angle X : X représente le nombre de liaisons covalentes entre le noyau observé et les (H, H) ou différents (C, H). Cette valeur est importante, puisqu'elle détermine la largeur du signal observé.

L'expérience par RMN à deux dimensions ou RMN bidimensionnelle (RMN-2D) repose sur une succession de trois intervalles de temps (temps de préparation, temps de mélange et temps de détection).

Dans l'expérience RMN 2D, nous distinguons quelques types de corrélations (Kwan *et al.*, 2008) :

- **Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC ^1H - ^{13}C)** : met en évidence les couplages scalaires $^1J_{\text{CH}}$.
- **Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC ^1H - ^{13}C)** : permet de visualiser les taches de corrélation entre un noyau ^{13}C et un noyau ^1H via un couplage à longue distance 2J et 3J. Nous pouvons, ainsi, observer les carbones quaternaires grâce aux protons se trouvant à des distances 2J et 3J. Cette expérience permet de déterminer l'enchaînement du squelette carboné de la molécule étudiée.
- **CORrelation SpectroscopY (COSY ^1H - ^1H)** : permet de mettre en évidence les protons qui sont couplés de façon scalaire, non équivalents et vicinaux. Permettent donc de retrouver l'enchaînement des protons sur le squelette de la molécule.

5. Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

La spectroscopie infrarouge (IR) est, également, l'un des outils les plus utilisés pour la caractérisation et l'identification des molécules organiques. Elle est basée sur l'interaction de la lumière infrarouge avec le nuage électronique des liaisons chimiques des biomolécules en permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans un échantillon et d'en caractériser les groupements moléculaires afin d'obtenir de nombreuses informations sur la conformation et les éventuelles interactions. La loi de Beer-Lambert est vérifiée en infrarouge, ce qui en fait une méthode d'analyse quantitative.

Lorsqu'une molécule absorbe de l'énergie sous la forme d'un rayonnement IR, l'amplitude des vibrations des liaisons moléculaires augmente, le retour à l'état normal libère de la chaleur. Plusieurs modes de vibrations sont possibles pour un groupe d'atomes donné. A chacun correspond une fréquence caractéristique. Ces modes fondamentaux sont responsables des principales bandes d'absorption.

La région infrarouge est localisée entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes (figure 18). Le domaine infrarouge s'étend de 0,8 μm à 1000 μm . Il comprend 3 zones : le proche infrarouge (0,8 à 2,5 μm soit 12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (2,5 à 25 μm soit 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm soit 400-10 cm^{-1}).

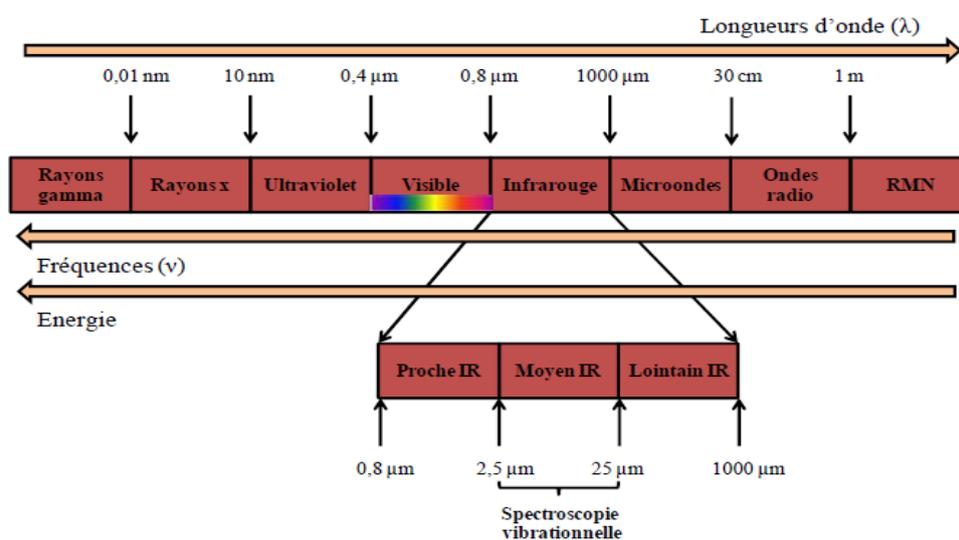


Figure 18 : spectres électromagnétiques.

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1: Isolement et caractérisation polyphasique d'actinobactéries producteurs d'antimicrobiens. Antagonisme d'isolats représentatifs

Les actinobactéries, anciennement actinomycètes, sont des bactéries filamenteuses, à paroi Gram positive, ayant une teneur élevée en bases nucléotidiques (G+C) qui varie entre 57 et 75% (Anandan *et al.*, 2016). Les actinobactéries sont ubiquitaires ; elles sont recensées en grand nombre dans le sol, et peuvent coloniser d'autres écosystèmes comme les milieux aquatiques (eaux douces et eaux marines), l'air, les débris végétaux et les produits alimentaires. Elles sont également rencontrées dans des milieux extrêmes, comme les sols polaires, les sols désertiques, les sols contaminés par les hydrocarbures, les pesticides et les métaux lourds, ou encore les milieux d'extrême salinité (Alvarez *et al.*, 2017). Ils présentent des aspects bénéfiques considérables, se résumant, en premier lieu, en leur aptitude à synthétiser des composés antimicrobiens à large spectre, contre les infections microbiennes qui peuvent toucher l'homme, animaux et plantes.

Le sol représente, donc, une source riche pour l'isolement des actinobactéries. Des travaux ont été entrepris sur la taxonomie et les potentialités antagonistes des actinobactéries isolées à partir de différentes sols ce qui permet, éventuellement, la découverte de souches pouvant avoir un potentiel de production élevée ou inexploitée d'antibiotiques.

Matériel et méthodes

1. Prélèvement des échantillons

Les sols de trois sites situés à l'Est Algérien sont explorés, à savoir : la forêt de la wilaya de Khenchela (conservation des forêts, Khenchela), le Djebel Chélia de la wilaya de Khenchela et la Sebkhah de Garah EL Guellif, située au nord de la ville de Ain Zitoun, à 12 Km de la ville d'Oum El Bouaghi.

Les échantillons de sol sont prélevés stérilement,

- Sol rhizosphérique du pin d'Alep (*Pinus Halepensis*), les racines des arbres sont dégagées, puis 100g du sol fermement lié aux racines sont prélevés (Yilmaz *et al.*, 2008). Les échantillons triés sont placés dans des flacons stériles et transportés au laboratoire.

Sol du Djebel Chélia et sol environnant la Sebkhah, 100 à 150 g de sols sont prélevés, après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, selon la technique dérivée de celle de Pochon et Tardieux (1962).

2. Isolement, purification et conservation des actinobactéries

Des suspensions mères ont été préparées après avoir introduit 10g de chaque échantillon dans des flacons contenant 100ml d'eau physiologique stérile.

L'isolement des actinobactéries a été réalisé sur milieu gélosé Olson (annexe 1) additionné d'un antifongique, la nystatine (50µg/l) et d'un antibactérien Gram (-) la polymyxine (20µg/l).

Pour chaque échantillon, des dilutions décimales de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7} sont préparées à partir des solutions mères. Par la suite, 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur le milieu Olson précédemment stérilisé et coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Ces dernières sont, alors incubées à 30 °C et observées après deux, trois et quatre semaines d'incubation.

À l'aide d'un microscope optique, les colonies d'actinobactéries sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique. Les colonies possédant un aspect typique aux actinobactéries sont purifiées sur milieu *Yeast Malt Extract Agar (YMEA)* + CaCO₃ (annexe 1).

Les isolats purs d'actinobactéries sont conservés, d'une part, dans le milieu *YMEA* coulé dans des tubes à essai inclinés avant solidification puis mis à +4 °C et d'autre part dans un milieu liquide *ISP₂* (annexe 1) dans des tubes eppendorf additionné de glycérol à raison de 20% (v/v) puis les tubes sont conservés à -20 °C.

3. Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries

3.1. Activité antibactérienne

a) Les bactéries-tests

L'activité antibactérienne des isolats purs d'actinobactéries a été recherchée contre les bactéries-tests obtenues auprès de l'*American Type Culture Collection (ATCC)*.

Les bactéries à coloration de Gram positive sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Les bactéries à coloration de Gram négative sont : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, et *Escherichia coli* ATCC 25922.

L'activité antibactérienne a été testée également contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA : *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) ATCC 43300.

À partir d'une culture de 24h sur gélose nutritive, une suspension de chaque bactérie-test est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par addition d'eau physiologique stérile en comparaison avec une solution de Mac Farland 0,5 de façon à obtenir une concentration de 10^6 UFC/ ml.

b) Technique des cylindres d'agar

Les isolats purs d'actinobactéries sont ensemencés sur milieu solide *YMEA* en stries très serrées, puis incubés pendant 7 jours à 30 °C. Par la suite, des cylindres de 6 mm de diamètres, de culture d'actinobactéries bien sporulées à raison de 10^8 spores/ml sont découpés stérilement, déposés à la surface du milieu Mueller Hinton (annexe1) préalablement ensemencé par le germe cible. Les boîtes ensemencées sont maintenues à +4 °C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances bioactives.

3.2. Activité antifongique

La capacité des isolats d'actinobactéries à inhiber le développement des moisissures phytopathogènes *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*, est déterminée sur milieu *Potato Dextrose Agar* (PDA: annexe 1), en utilisant la technique des cylindres d'agar. Un disque de 6 mm de diamètre issu d'une culture pure de l'agent phytopathogène est déposé au centre de la boîte. Ensuite, des disques de l'actinobactérie sont placés parallèlement et autour à une distance de 3 cm du disque de champignon. Ces boîtes sont incubées à 30 °C pendant 14 jours. Des boîtes contenant justes le disque de champignon sont incubées dans les mêmes conditions, elles servent de contrôles (Tour *et al.*, 2004). Après les périodes d'incubation, l'évaluation de l'inhibition est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition (I%) de la croissance mycélienne selon la formule suivante $I\% = (C-T/C) \times 100$ où C: la croissance de la moisissure dans la boîte contrôle; T : croissance de *F. oxysporum* ou *A. niger* en présence des souches étudiées.

4. Antagonisme d'isolats sélectionnés producteurs d'antimicrobien

Les isolats d'actinobactéries SF10, SFKH4 et SFKH10 montrant une bonne activité antimicrobienne ont été testés pour leur effet antagoniste contre une bactérie phytopathogène :

Streptomyces scabies (agent causal de gale commune de la pomme de terre). Ce test est réalisé en utilisant la technique des cylindres d'agar (même principe cité précédemment sauf que le test soit sur le milieu *YMEA*).

5. Identification des souches possédant une activité antimicrobienne

Les trois isolats d'actinobactéries SF10, SFKH4 et SFKH10 obtenus du sol montagneux et du sol rhizosphérique respectivement, présentant une forte activité antimicrobienne ont fait l'objet d'une caractérisation polyphasique.

5.1. Caractères morphologiques et culturels

Les caractères morphologiques et culturels (la couleur du mycélium aérien et du substrat ainsi que la production de pigments diffusibles) sont déterminés sur des milieux de culture spécifiques : *ISP*₁, *ISP*₂, *ISP*₃, *ISP*₄ et *ISP*₇ (annexe 1). Ces milieux sont préconisés par l'*International Streptomyces Project (ISP)* (Shirling et Gottlieb, 1966) et sur les milieux *SCA*, Gausse et *SMK* (annexe 1) (Athalye *et al.*, 1985). Les milieux sont coulés dans des boîtes de Pétri et sont ensuite ensemencés par des stries très serrés.

L'évaluation de l'importance de la croissance et du développement des mycéliums et de leur pigmentation sur chaque milieu est observée après 14 jours d'incubation à 30 °C. La présence ou l'absence dans la gélose de pigments diffusibles autres que les pigments mélanoides, est observée en même temps.

5.2. Aspect des souches en microscopie optique (Technique des lames et lamelles)

La micromorphologie concerne, principalement, la morphologie des chaînes de spores. Elle doit être déterminée par l'observation d'une culture complètement mature avec une bonne sporulation.

-Préparation de l'inoculum

Les isolats d'actinobactéries sont ensemencés sur le milieu *ISP*₂ gélosé réparti dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 14 jours. La surface des colonies

est raclée, ainsi les spores et les fragments mycéliens sont récupérés et introduits dans des tubes à essai contenant de l'eau physiologique stérile (Shirling et Gottlieb, 1966).

-Culture sur lame

Les isolats sont ensemencés sur milieu solide *ISP*₂. Ensuite, une portion rectangulaire d'agar est découpée puis déposée sur une lame et recouverte avec une lamelle. Ainsi ces cultures sur lames sont incubées à 30 °C pendant 14 jours. L'observation se fait sous microscope optique à grossissement (X 100).

- Culture sur lamelle

Une lamelle stérile est, insérée, délicatement dans un milieu gélosé *ISP*₂ de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec celui-ci. Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu gélosé. Après 14 jours d'incubation à 30 °C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose entraînant quelques fragments du mycélium. Elle est, ensuite, déposée sur une lame et examinée au microscope optique à grossissement (X 100).

5.3. Aspect des souches en microscope électronique à balayage (MEB)

Les observations au microscope électronique à balayage (ou SEM pour Scanning Electron Microscopy (figure 19) ont été réalisées au laboratoire de microscopie du département de physique (Université Trento) avec la collaboration du docteur Nicola Bizanella.

La préparation des échantillons est effectuée selon la technique de Kumar *et al.* (2011). À l'aide d'une pipette pasteur stérile, les souches d'actinobactéries sont ensemencées sur milieu de sporulation *YMEA* + CaCO₃ coulé en boîtes de Pétri. Un cylindre en métal stérile de 6mm a été inséré, préalablement, sur la boîte de Pétri. Après une période d'incubation de 30 C⁰, pendant 7 jours, la souche s'est développée sur toute la boîte y compris le cylindre.

Par la suite, le cylindre est retiré de la boîte de Pétri entraînant une partie de la souche. La couche en surface de chaque cylindre est transférée sur des plots métalliques porte-objet qui sont introduits dans une enceinte du métalliseur sous vide. Au cours de ce processus de métallisation d'une heure de temps, la pression est augmentée en introduisant le gaz d'Argon. Sous l'effet d'un champ électrique, des électrons libres entraînés en spirale par un système

magnétique entrent en collision avec les atomes d'Argon, ce qui génère des ions Ar^+ . Ces ions sont accélérées vers la cathode qu'ils bombardent avec assez d'énergie pour arracher des atomes d'or qui tombent en pluie sur la surface des échantillons, formant ainsi une fine couche conductrice.



Figure 19: microscope électronique à balayage (SEM), université Trento, Italie.

5.4. Analyse des constituants pariétaux (chimiotaxonomie)

La chimiotaxonomie, au sens large du terme, est basée sur la détermination des acides aminés du peptidoglycane, des sucres, des quinones, des lipides polaires et de l'acide mycolique de la paroi cellulaire des actinobactéries (Schleifer et Kandler, 1972).

L'analyse chimique des constituants de la paroi cellulaire des isolats sélectionnés constitue un critère déterminant de distinction des différents groupes d'actinobactéries.

Dans le sol, le genre *Streptomyces* est largement dominant. Donc, nous nous sommes limités à déterminer, seulement, au niveau de la paroi : l'isomère LL ou DL (mésos) de l'acide diaminopimélique (DAP), la présence ou non de la glycine et l'absence de sucres caractéristiques (Murray *et al.*, 1989).

5.4.1. Production de biomasse

Pour pouvoir réaliser ces analyses, il faut produire assez de biomasse. Ainsi, les isolats (SF10, SFKH4 et SFKH10) sontensemencés à raison de 10% dans des erlenmeyer d'un litre

contenant le milieu *ISP*₂ et incubés sous agitation à 30 °C pendant 14 jours. Les mycéliums sont récupérés par filtration, lavés à l'eau distillée stérile puis séchés.

5.4.2. Détermination des acides aminés pariétaux (acide diaminopimélique et glycine)

La technique utilisée est celle de Backer *et al.* (1964) modifiée. Elle est réalisée selon le protocole suivant : 10 mg du mycélium sec de chaque isolat sont hydrolysés pendant 18 h à 100 °C par 1 ml de HCl 6N dans des tubes à vis, hermétiquement fermés, mis dans un four à microondes. Les hydrolysats sont recueillis, après filtration, sur membrane en verre puis concentrés à sec à l'aide d'un bain de sable chaud. Des lavages répétés à l'eau distillée sont effectués jusqu'à l'élimination totale de l'HCl. Le résidu sec est finalement repris dans 0,3 ml d'eau distillée puis analysé par chromatographie en gel de silice en utilisant le système méthanol / H₂O / HCl 10N/ pyridine (80 : 17,52 : 5 : 10) comme phase mobile. Les résultats sont déterminés par comparaison avec le mélange glycine et isomères méso et LL de l'acide diaminopimélique.

5.4.3. Détermination des sucres pariétaux

La méthode de caractérisation des sucres utilisée est celle de Lechevalier et Lechevalier, (1970). Dans des tubes à vis contenant 50 mg de mycélium est ajouté 1ml d'acide sulfurique 1N puis les tubes sont hermétiquement scellés et introduits dans un four à microondes porté à 100 °C. L'hydrolyse acide dure 2h. Les hydrolysats acides sont neutralisés avec une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de Baryum jusqu'à obtention d'un pH neutre. Le précipité blanc formé est éliminé par centrifugation à 4000 tr/min durant 20 min.

Le surnageant est recueilli, évaporé à sec et le résidu final obtenu est dissout dans 0,3 ml de mélange eau distillée et acétonitrile puis analysé par la technique chromatographique HPLC-ELSD. La concentration des standards (sigma), (ribose, glucose, galactose, mannose, xylose et madurose) et les échantillons, est de 1mg/ml dans l'acétonitrile/H₂O (70 : 30). Les analyses ont été effectuées par l'appareil Agilent technologies 1200 séries en utilisant la colonne RP18 Phenomenex, luna 5u, 250x4, 60 mm suivant le mode isocratique (acétonitrile / H₂O 90 : 10), sous un débit de 1ml/min et d'une température de 45 °C.

6. Étude des caractères physiologiques

6.1. Pigments diffusibles et pigments mélanoides

La mise en évidence de la production de pigment soluble (autres que le brun-noir) est réalisée par culture sur le milieu gélosé *ISP*₅ (annexe 1) (Shirling et Gottlieb, 1966). Les milieux *ISP*₆ et *ISP*₇ (annexe 1) en gélose inclinée sontensemencés en surface pour mettre en évidence les pigments mélanoides produits par les actinobactéries. Un tube nonensemencé sert de témoin. L'observation de la couleur brune noire caractéristique des pigments mélanoides se fait au 2^{ème} jour et au 4^{ème} jour d'incubation à 30 °C en comparant les tubesensemencés avec le témoin (Shirling et Gottlieb, 1966; Mocheva *et al.*, 2002).

6.2. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques

L'effet de trois inhibiteurs chimiques (chlorure de sodium, phénol et crystal violet) sur la croissance des trois isolats a été déterminé. Les isolats sontensemencés sur milieu Bennett modifié (MBA) (Annexe 1) additionné de composés inhibiteurs aux concentrations suivantes : chlorure de sodium 4, 7, 10, 13 % (P/V), phénol 0,1% (P/V), crystal violet 0,0001 % (P/V). La présence ou l'absence de la croissance est enregistrée après 14 jours d'incubation par comparaison avec le témoin (Gordon *et al.*, 1977 ; Williams *et al.*, 1983a).

6.3. Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de 10% de lait écrémé en poudre sontensemencés et incubés à 30 °C. Après 14 jours, la coagulation et la peptonisation sont notées (Singleton *et al.*, 1998).

6.4. La résistance aux antibiotiques

La mise en évidence de la sensibilité de nos isolats aux différents antibiotiques est basée sur la méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (*YMEA*), recommandée par Williams *et al.* (1983b). Les différents antibiotiques utilisés sont l'ampicilline (AMP), l'erythromycine (E), la spiramycine (SP), la gentamicine (CN), l'amikacine (AK), l'imipénème (IPM), acide nalidixique (NA), le cefuroxime (CXM), la streptomycine (S), l'amoxicilline (AMC) et fosfomycine . À partir des cultures pures des trois isolats, une colonie estensemencée par stries sur la surface de la gélose puis les disques d'antibiotiques y sont déposés. Après une pré-diffusion de 30 min, les boîtes sont incubées à 30 °C pendant une semaine, ensuite les diamètres d'inhibition sont mesurés.

7. Étude des caractères biochimiques

7.1. Utilisation des composés glucidiques

La capacité des isolats à utiliser les substrats carbonés est déterminée par la méthode de Shirling et Gottlieb (1966) avec le milieu de base *ISP*₉ (annexe 1), les substrats suivants sont testés: glucose, lactose, cellulose, arabinose, D-xylose, saccharose, D-fructose, D-maltose, D-galactose, D-ribose, sorbitol, inositol, mannitol et des acides organiques (propionate de sodium et succinate de sodium). L'utilisation des différents substrats est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur les milieux servant de contrôle positif (milieu *ISP*₉ contenant 1% de glucose) et de contrôle négatif (milieu *ISP*₉ sans source de carbone).

7.2. Utilisation des sources azotées

La mise en évidence de la capacité des souches à utiliser différentes sources d'azote a été déterminée selon la méthode décrite par Williams *et al.* (1983a). Le milieu *ISP*₉ est additionné par des substrats azotés à une concentration de 0,1% (P/V). Les différentes substances utilisées sont : la méthionine, l'acide aspartique, la cystéine, la tyrosine, l'arginine, la proline, la glycine, le tryptophane. Les résultats d'assimilation sont notés après 14 jours par comparaison avec le témoin positif (asparagine) et négatif (sans source d'azote ajoutée).

7.3. Production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

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

7.4. La production de la chitinase

La mise en évidence de l'activité chitinolytique consiste à ensemencer les isolats d'actinobactéries par simple strie sur milieu *Colloidal Chitin Agar* (CCA) (annexe 1). Après 8 jours d'incubation, la production de chitinase extracellulaire est traduite par l'apparition de zones claires autour des colonies (Hsu *et al.*, 1975).

7.5. Réduction des nitrates

La nitrate-réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des ions nitrates NO_3^- en ions NO_2^- (nitrite) ou en N_2 . Elle est mise en évidence selon le protocole de (Singleton, 1999). 10 ml de bouillon nutritif contenant 0,1% de nitrate de potassium (KNO_3) sontensemencés et incubés à 30 °C. Au 5^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} jour d'incubation, trois gouttes des réactifs de Griess I et Griess II sont ajoutées à 1ml de culture. La réduction de nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligramme de poudre de zinc sont alors ajoutés. L'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche). En absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites).

7.6. Les activités d'hydrolyse

L'hydrolyse de la gélatine (0,4%), la caséine (1%), l'amidon (1%) la tyrosine (0,5%) l'adénine (0,1%) a été déterminée sur le milieu de base de l'*ISP*₉. L'hydrolyse du tween 80 à 0,1% a été testée sur milieu de Sierra (annexe 1). Pour l'hydrolyse de la pectine (1%), Les souches sontensemencées sur le milieu Pectine Agar (annexe 1). Les activités de dégradation sont notées après 14 jours d'incubation. Pour les composés insolubles, les activités ont été détectées par l'apparition, autour des colonies, de zones claires. Cependant, le résultat pour la gélatine, l'amidon et la pectine est notée après inondation des cultures respectivement avec la solution de chlorure mercure (HgCl_2), de lugol et une solution de CTAB (*bromure d'héxadecyl tri-méthylammonium*) à 1% (P/V) et laisser à température ambiante pendant quelques minute (Hankin *et al.*, 1971 ; Williams *et al.*, 1983a ; Nicemol, 2006).

La dégradation de cellulose a été déterminée selon la méthode décrite par (Maki *et al.*, 2011). A partir d'une culture pure des isolats, une colonie est prélevée, ensuite déposée sur boite contenant du *Carboxyméthyl cellulose* (CMC) gélosé (annexe 1). La production de cellulase est mise en évidence par la coloration à la solution Iodine (annexe 2). Pour ce faire, un volume de 10 ml est coulé dans la boite. Les colonies développant une auréole montre que les souches en question possèdent une activité cellulasique.

8. Identification phylogénétique

8.1. Extraction de l'ADN

La méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN total des cultures pures des trois isolats sélectionnés (SF10, SFKH4 et SFKH10) est celle de Pospiech et Neumann (1995). Ainsi, 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle est centrifugé pendant 15 min à 4000 g. Le culot est traité par 5ml de tampon de lyse SET (NaCl :75 mM, EDTA : 25mM Tris-HCl : 20 mM, pH 7,5) ; suivi d'un traitement par le lysozyme à une concentration de 1 mg/ml, le mélange est incubé pendant 60 min à 37 °C. Les protéines associées à l'ADN sont ensuite hydrolysées par 0,6 ml du sulfate de sodium dodecyl (SDS) à 10% et la protéinase K 0,5 mg/ml. L'ensemble est mélangé puis incubé pendant 2 h à 55 °C. Par la suite, 5 ml du NaCl (5 mM) et 7,5 ml du chloroforme sont ajoutés au lysat et incubé 30 min à une température ambiante. Le mélange est centrifugé à 4500g pendant 15 min puis additionné de 0,6 ml d'isopropanol. Enfin le tube est inversé brièvement et l'ADN est rincé et récupéré à l'aide d'une pipette pasteur, et mis dans 5 ml d'éthanol à 70%, puis séché à l'air libre. Le culot est re-suspendu dans 5ml du tampon TE (10 mM Tris, EDTA 1 mM, pH 8) et incubé à 55 °C. L'ADN dissout est traité avec la ribonucléase (ARNase) (20 µg/ml), puis incubé à 37 °C durant 1 heure.

8.2. Quantification de l'ADN

Elle consiste à déterminer la quantité d'ADN dans les échantillons et sa pureté. Un échantillon d'ADN extrait est dilué 200 fois dans du tampon TE. Sa densité optique (DO) est mesurée au spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes différentes (260nm et 280nm). Idéalement, le rapport A260/280 doit être compris entre 1,8 et 2,0. S'il est inférieur ou égal à 1,8, il y a une contamination par les protéines. S'il est supérieur ou égal à 2,0, il y a une contamination par les ARN.

8.3. Amplification des séquences d'ADNr 16S

Il s'agit d'une amplification par PCR d'une séquence d'ADN par extension de deux amorces universelles, la directe F27 et la reverse R1492 : 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Heuer *et al.*, 1997; Monciardini *et al.*, 2002; Coombs et Franco, 2003). La paire d'amorces a été fournie par Integrated DNA Technologies (IDT, USA) avec une concentration de 100 µM. Les microtubes contiennent 2µl de l'ADN (200 ng/µl) et 50 µl d'un mélange réactionnel

(tableau 1). L'amplification est réalisée pour un volume de 200 µl, dans un Thermocycleur TM C1000 (BIORAD My CyclerT^M) qui permet de programmer les durées et les températures des trois étapes d'un cycle ainsi que le nombre de cycles désirés. Après une dénaturation initiale à 98 °C pendant 4 min, le programme d'amplification est exécuté durant 30 cycles (94 °C pendant 1 min, 52 °C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min); le dernier cycle est suivi d'une phase d'élongation terminale à 72 °C pendant 10 min, puis refroidi à 4 °C.

Afin de vérifier les amplicons, les produits de la PCR ont été examinés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% en tampon TAE 1X (Tris Acétate-EDTA; Euromedex) additionné de 0,5 µg/ml de bromure d'éthydiuim (BET) et en présence d'un marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (Promega). Après migration d'une heure, le gel est trempé dans une solution de bromure d'éthydiuim (0,5%) pendant 10 min puis le gel est rincé dans de l'eau pendant 15 min. Le gel est placé sous les rayons UV pour visualiser et photographier les bandes d'ADNr 16S. Les fragments d'ADN sont visibles aux UV à 300 nm grâce au bromure d'éthydiuim qui s'est inséré entre les plateaux de bases de l'ADN.

Tableau 1 : composition du milieu réactionnel de la PCR de l'ADNr 16S par la paire d'amorces universelle.

Composé	Volume µl
Eau stérile	202,5
DMSO 50%	30
Amorce F (100 µM)	6
Amorce R (100 µM)	6
Tampon de la taq	30
dNTP (25 mM) (Fermentas)	7,5
Taq polymerase (5 U.ml ⁻¹)	3
Solution d'ADN (200 ng/ µl)	2

8.4. Séquençage de l'ADNr 16S et analyses phylogénétiques

Les produits de la PCR, amplifiés et purifiés, sont séquencés par la méthode de Sanger. Elle est basée sur l'incorporation de didésoxynucléotides. Le séquençage est réalisé par le service de *LGC genomics* (Berlin, Allemagne). Les séquences, une fois déterminées, sont comparées à celles des espèces disponibles dans les banques génomiques de données en utilisant le *NCBI Blast* disponible sur Internet au niveau du site Web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Les alignements des séquences sont réalisés grâce au logiciel Sequencher (version 4.7). L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant l'option « One

Click » disponible sur le site Web de www.phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008) et la construction de l'arbre par TreeDyn. PhyML.

Résultats

1. Isolement et purification des actinobactéries

Les colonies d'actinobactéries apparaissent après 2 à 4 semaines d'incubation, elles sont souvent compactes et bien incrustées dans la gélose (figure 20). Après observation microscopique, les colonies d'actinobactéries ont été purifiées par repiquage dans le milieu YMEA incubées à 30 °C pendant 7 jours. Ainsi, 99 isolats d'actinobactéries ont été obtenus et se répartissent comme suit : 65 de la rhizosphère de *Pinus Halepensis* M, 11 du sol montagneux et 23 du sol environnant de la Sebkhia Garrag El Guellif (tableau 2). La figure 21 montre l'aspect de quelques isolats d'actinobactéries après l'étape de purification.

Tableau 2 : nombre d'isolats d'actinobactéries par site exploré.

Sol	Site de prélèvement	Nombre d'isolats
Sol forestier rhizosphérique (SFKH)	Forêt de Khenchela	65
Sol forestier montagneux (SF)	Djebel Chélia, Khenchela	11
Sol de Sebkhia (SSG)	Garah El Guellif (Oum El Bouaghi)	23

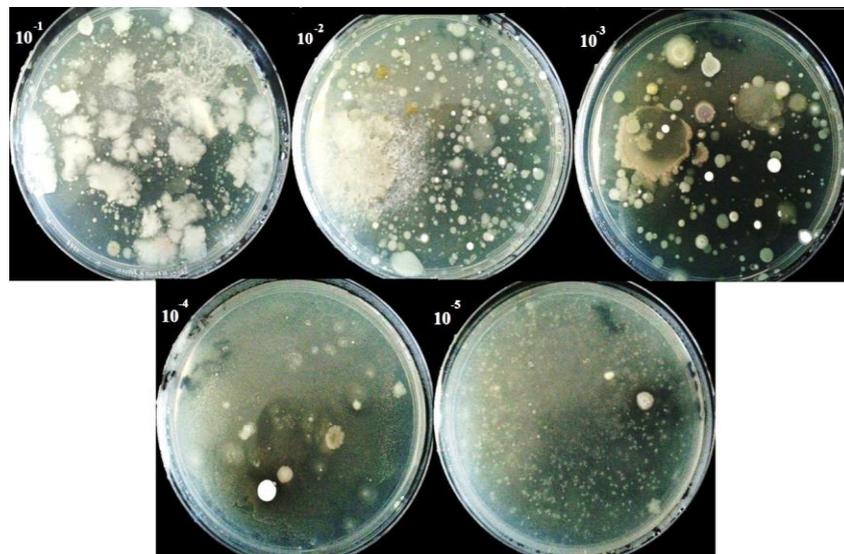


Figure 20 : photographie de colonies d'actinobactéries sur milieu Olson (sol rhizosphérique).

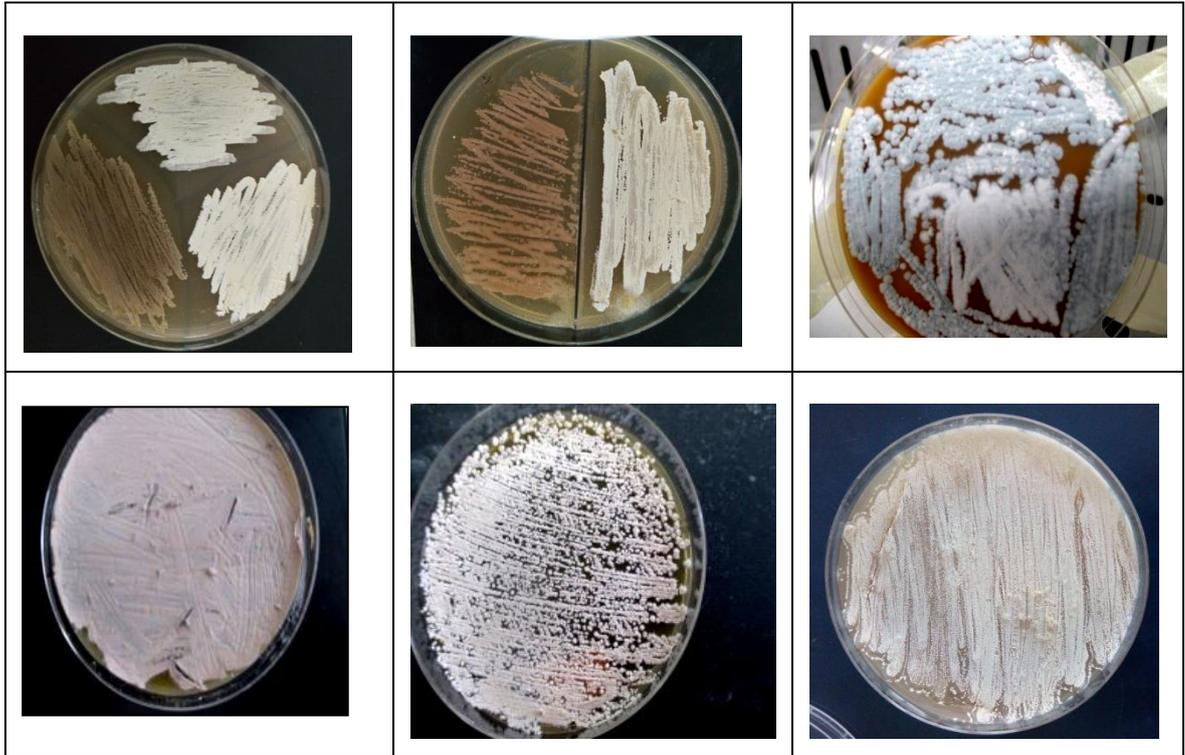


Figure 21 : aspect sur milieu solide *YMEA* + CaCO_3 des isolats purs d'actinobactéries.

2. Activité antimicrobienne

2.1. Des isolats d'actinobactéries du sol rhizosphérique

Les isolats montrant une activité sont présentés dans le tableau (3). Sur les 65 souches d'actinobactéries provenant du sol rhizosphérique, 95% d'entre elles ont présenté une activité antibactérienne et/ ou antifongique vis-à-vis au moins de l'une des souches cibles. Et, seulement 24% des isolats ont inhibé, au moins, la croissance du mycélium d'un champignon phytopathogène.

La majorité des souches provenant du sol rhizosphérique présente une activité contre les bactéries à coloration de Gram positive. Les isolats SFKH4, SFKH10 et SFKH18 se sont avérés les plus actifs pour inhiber la croissance de *B. subtilis*, *S. aureus* et MRSA (figure 22). L'isolat SFKH10 a présenté la plus grande activité vis-à-vis de la souche MRSA avec un diamètre d'inhibition de 40 mm (figure 22). L'isolat SFKH4 a montré une importante activité contre les Gram (-) : *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Tableau 3 : activité antimicrobienne des isolats du sol rhizosphérique.

Isolats, SFKH	Diamètre d'inhibition (mm)					Pourcentage d'inhibition (% I)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>
1	11	11	15	-	-	-	-
3	10	20	-	-	-	-	-
4	30	35	39	30	20	-	32,43%
5	-	15	15	-	-	-	-
6	10	10	10	-	-	-	-
7	-	13	15	-	-	-	-
8	10	-	10	-	-	-	-
9	16	30	26	-	-	-	-
10	30	39	40	-	-	-	-
11	30	-	-	-	-	-	-
13	21	20	20	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	44,44%	32,43%
17	-	-	15	-	-	-	-
18	33	30	35	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	10	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	40,54%	-
22	25	22	30	-	-	29,72%	-
26	-	-	-	-	-	-	-
27	20	-	-	-	-	37%	-
28	20	28	26	-	-	54,05	66,66%
33	-	-	-	-	-	35%	-
34	-	10	-	-	-	-	-
36	30	15	-	-	-	55,55%	43,24%
37	-	-	-	-	-	-	-
38	25	30	26	-	-	66,66%	45,94%
39	-	-	-	-	-	55,55%	-
40	10	20	15	-	-	-	-
41	27	25	22	-	-	-	-
42	20	23	11	-	-	-	-
45	17	-	-	-	-	-	-
46	17	22	19	-	-	75,55%	48,64%
47	22	25	23	-	-	51,11%	32,43%
48	-	-	-	-	-	-	-
49	17	22	19	-	-	66,66%	48,64%
50	10	22	15	-	-	44,44%	-
55	-	-	-	-	-	46,66%	-
61	-	-	-	-	-	57,77%	-
62	-	-	-	-	-	44,44%	37,83%

(-) : absence d'inhibition

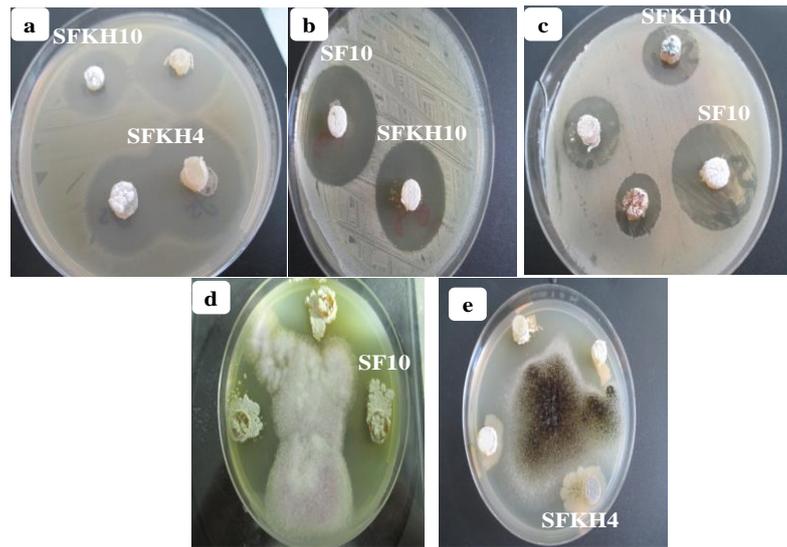


Figure 22 : activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique), sur milieu $YMEA+CaCO_3$ des isolats purs d'actinobactéries, évaluée par la technique des cylindres d'agar. (a): *Staphylococcus aureus* 25, (b) : MRSA, (c) : *Bacillus subtilis*, (d) : *Fusarium oxysporum*, (e) : *Aspergillus niger*.

2.2. Des isolats d'actinobactéries du sol montagneux

Les isolats provenant du sol montagneux de Djebel Chélia ont montré des activités intéressantes notamment pour les isolats SF1 et SF10 (tableau 4). Ces deux derniers ont présenté des activités importantes contre les bactéries et les champignons testés. L'isolat SF10 s'est avéré la plus actif, notamment, contre *B. subtilis* avec un diamètre de zone d'inhibition de 40mm (figure 22).

Tableau 4: activité antimicrobienne des isolats de sol forestier (Djebel Chélia).

Isolats SF	Diamètre d'inhibition (mm)					Pourcentage d'inhibition (%I)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>
1	24	31	29	-	-	-	-
2	-	25	23	-	-	-	-
10	40	38	39	-	-	35,13%	37,77%
11	19	25	25	-	-	35,13%	40%

(-) : absence d'inhibition

2.3. Des isolats d'actinobactéries du sol environnant de la Sebka

Les isolats provenant de l'échantillon de sol de Sebka, ont montré une activité antimicrobienne moins importante (tableau 5) par comparaison aux isolats de la rhizosphère et du sol montagneux. 30% des souches ont une activité antibactérienne représentée par des zones d'inhibition de diamètre variant de 16 à 29 mm. Par contre aucun des isolats n'agit sur *F. oxysporum* et *A. niger*.

Tableau 05 : activité antibactérienne des isolats de sol environnant de la Sebka.

Les isolats SSG	Diamètre d'inhibition (mm)				
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
1	29	23	-	-	-
13	10	16	20	-	-
14	29	-	-	-	-
17	16	13	20	-	-
18	-	15	20	-	-
19	-	-	-	-	-
20	16	14	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	-	20	-	-	-

(-) : absence d'inhibition

3. Antagonisme des isolats producteurs d'antimicrobiens sélectionnés

L'antagonisme vis-à-vis de l'actinobactérie phytopathogène (*S. scabies*) des trois isolats SF10, SFKH4 et SFKH10 sélectionnés sur la base de leur potentiel de production d'antimicrobiens a été recherché. Celui-ci a été évalué par la technique des cylindres d'agar (tableau 6).

Les trois isolats inhibent la croissance de l'espèce *S. scabies*. La zone d'inhibition obtenue avec la souche SF10 (27mm) est plus importante que celles obtenues avec les deux autres isolats SFKH4 et SFKH10.

Tableau 6 : activité antagoniste vis-à-vis *S. scabies* des trois isolats.

isolats	SF10	SFKH4	SFKH10
Diamètre d'inhibition (mm)	27	18	15

4. Identification des souches

4.1. Aspect macroscopique

Les différentes observations concernant la croissance, le développement du mycélium aérien et la pigmentation des isolats étudiés sont consignées dans le tableau 7.

L'isolat SF10 a une bonne croissance sur les milieux *ISP*₅, *ISP*₇ et *YMEA* en développant un mycélium aérien abondant. Sur tous les autres milieux, la souche SF10 ne présente pas de mycélium aérien, des fois un faible développement est observé. La coloration du mycélium de substrat varie suivant les milieux, elle est beige sur les milieux *ISP*₅ et *SMK*.

Au 14^{ème} jour d'incubation, l'isolat SFKH4 a une bonne croissance sur les milieux *ISP*₄, *ISP*₂, *Gausse* et *YMEA* en développant un mycélium aérien abondant. Sur tous les autres milieux, l'isolat SFKH4 présente un mycélium aérien moins important et parfois il est absent totalement. Sa pigmentation sur les milieux de l'*ISP* tend vers une couleur beige, gris ou violet (figure 23). La coloration du mycélium de substrat varie suivant les milieux, elle est jaune sur l'*ISP*₇ et vert sur le milieu *Gausse*. L'isolat SFKH4 élabore un pigment, de couleur jaune, qui diffuse dans tout le milieu *ISP*₇.



Figure 23: culture de l'isolat SFKH4 sur différents milieux de cultures.

Du 14^{ème} jour d'incubation, SFKH10 présente une très bonne croissance sur les milieux *ISP*₄, *YMEA* et *Gausse* avec une sporulation abondante, par contre elle ne sporule pas sur les milieux *ISP*₆, *ISP*₇ et *SCA*. Elle forme des colonies de couleur jaune et grise. Sur les autres milieux, elle ne se développe pas. La coloration du mycélium de substrat varie du beige, jaune au marron. L'isolat SFKH10 élabore des pigments diffusibles qui virent au jaune sur le milieu *ISP*₆.

Tableau 7 : aspect macroscopique des isolats sélectionnés.

	Milieux de culture	Croissance	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Pigment diffusible
SF10	<i>ISP₁</i>	Moyenne	Beige	Beige	-
	<i>ISP₂</i>	Moyenne	Jaune claire	Beige	-
	<i>ISP₅</i>	Bonne	Beige	Blanc	-
	<i>ISP₆</i>	Moyenne	Jaune	Beige	-
	<i>ISP₇</i>	Bonne	Marron claire	Blanc	-
	<i>SMK</i>	Très faible	Beige fonce	Blanc	-
	<i>SCA</i>	Très faible	Jaune claire	Blanc	-
	<i>Gousse</i>	Très faible	Beige fonce	Beige	-
	<i>YMEA</i>	Très Bonne	Beige	Jaune	-
	<i>ISP₃ et ISP₉</i>	-	-	-	-
	SFKH4	<i>ISP₁</i>	Faible	Jaune	Beige
<i>ISP₂</i>		Bonne	Vert-marron	Violet claire	-
<i>ISP₄</i>		Bonne	Gris	Violet	-
<i>ISP₅</i>		Moyenne	Jaune	Beige	Jaune
<i>ISP₆</i>		Très faible	Jaune	Jaune claire	-
<i>ISP₇</i>		Moyenne	Jaune	Beige	Jaune
<i>SMK</i>		Très faible	Beige	Marron	-
<i>SCA</i>		Fiable	Vert	Blanche	-
<i>Gousse</i>		Bonne	Vert	Violet claire	-
<i>YMEA</i>		Bonne	Marron fonce	Mauve foncé	-
<i>ISP₃ et ISP₉</i>		-	-	-	-
SFKH10	<i>ISP₁</i>	Faible	Beige	Blanc	-
	<i>ISP₂</i>	Moyenne	Marron claire	Gris claire	-
	<i>ISP₃</i>	Très faible	Beige	Gris	-
	<i>ISP₄</i>	Bonne	Gris claire	Vert	-
	<i>ISP₆</i>	Moyenne	Jaune	Jaune	Jaune
	<i>ISP₇</i>	Moyenne	Beige	Jaune	-
	<i>SMK</i>	Moyenne	Marron claire	Gris	-
	<i>SCA</i>	Moyenne	Beige	Gris	-
	<i>Gousse</i>	Bonne	Beige claire	Gris claire	-
	<i>YMEA</i>	Très bonne	Beige claire	Bleu ciel	-
	<i>ISP₅ et ISP₉</i>	-	-	-	-

(-) absence des pigments ou pas de croissance

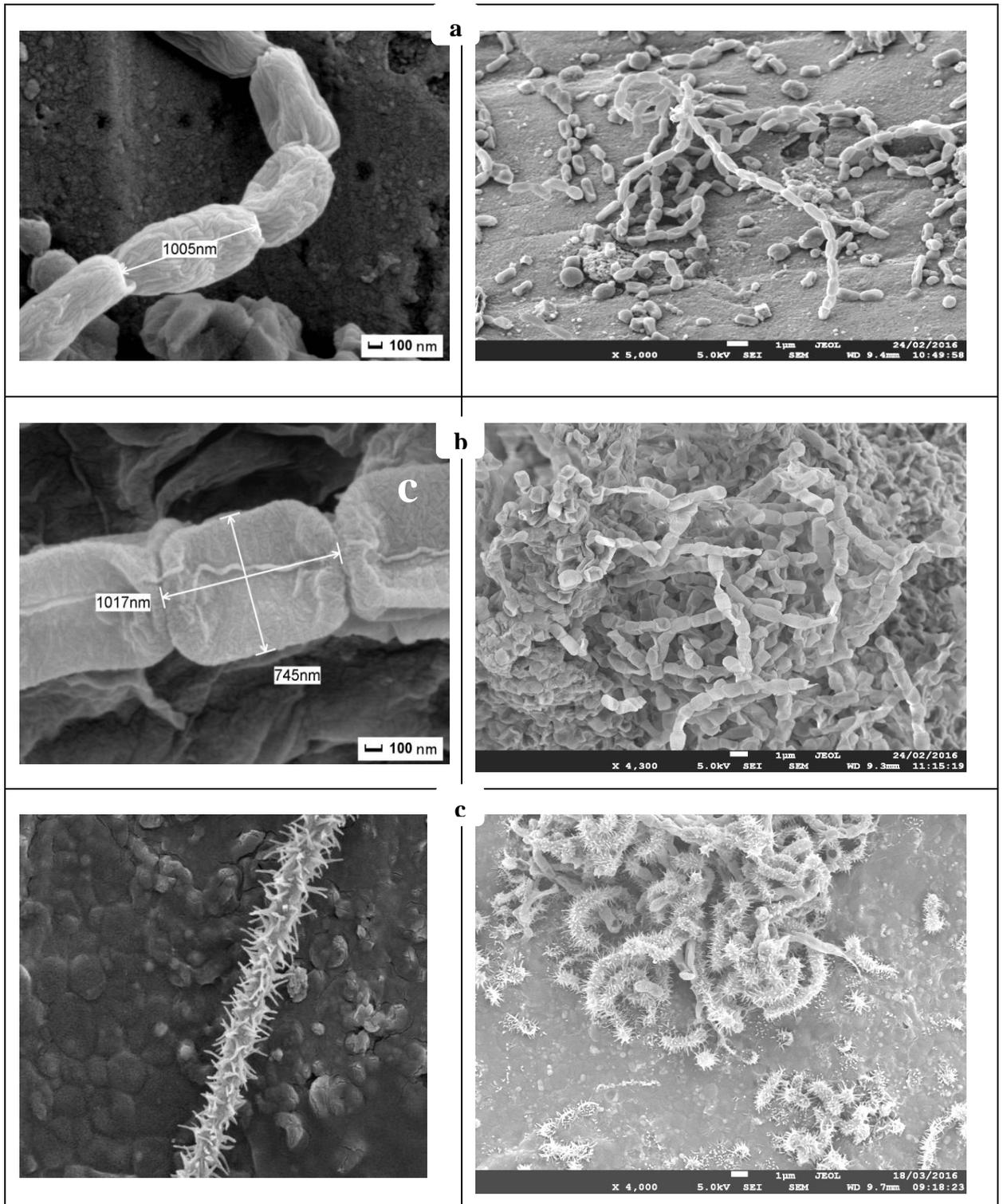


Figure 24 : la morphologie des chaînes de spores: (a) SF10, (b) SFKH4, (c) SFKH10, après 14 jours de croissance sur milieu *YMEA*, par microscope électronique à balayage (Université Trento, Italie).

4.2. Aspect en microscopie optique et électronique

Les isolats ont été cultivés sur le milieu permettant le maximum de sporulation (*YMEA*). Les mycéliums (ou mycélia) aériens observés par microscopie mettent en évidence des hyphes épaisses, très ramifiées pour SFKH4 et moyennement pour les deux autres isolats. Les hyphes portent de longues chaînes de spores droites de type rectiflexible (RF) pour les isolats SF10 et SFKH4. Aucune structure particulière, sporangium, sclérote ou synéma n'a été observée chez les trois isolats étudiés. La forme des spores est cylindrique pour les isolats SF10 et SFKH4 et spirale pour l'isolat SFKH10. Les spores de tous les isolats ne présentent aucune mobilité. Les formes des spores observées par microscopie électronique à balayage viennent confirmées celles observées par la technique des lames et des lamelles (Figure 24).

4.3. Chimiotaxonomie

La chromatographie sur CCM des extraits provenant des trois mycéliums et comparativement aux standards (Sigma) a montré la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et de la glycine pour les trois isolats SF10, SFKH4 et SFKH10.

L'analyse par HPLC-DAD-ELSD des sucres de la paroi cellulaire de nos isolats a révélé l'absence des sucres caractéristiques en comparant aux sucres standards injectés en HPLC dans les mêmes conditions. Ces isolats possèdent, donc, une paroi de type I/C. L'ensemble de ces caractéristiques nous permettent de classer ces isolats au genre *Streptomyces* (Murray *et al.*, 1989).

4.4. Caractères physiologiques

SFKH10 élabore des pigments mélanoides brun/noir sur le milieu *ISP*₆ mais pas sur le milieu *ISP*₇. Cependant, SFKH4 et SF10 ne produisent aucun pigment mélanoïde, quel que soit le milieu utilisé (figure 25).



Figure 25 : production de pigment mélanoïde.

L'isolat SFKH10 montre une bonne croissance en présence des différentes concentrations de NaCl utilisées et du phénol. Par contre en présence de Crystal violet sa croissance est affectée. Tandis que l'isolat SF10 ne se développe pas en présence du phénol et du Crystal violet et ne tolère pas des concentrations de NaCl égales ou supérieures à 7% (tableau 8). Contrairement aux deux autres isolats, l'isolat SFKH4 présente une bonne croissance en présence de Crystal violet et ne tolère pas des concentrations en NaCl supérieures à 4% P/V. En présence de phénol, sa croissance est fortement affectée (tableau 8).

Tableau 8 : croissance des isolats étudiés en présence d'inhibiteurs.

	SF10	SFKH4	SFKH10
NaCl 4%	+++	+	++
NaCl 7%	±	-	++
NaCl 10%	-	-	++
NaCl 10%	-	-	++
Phénol	-	±	+++
Crystal violet	-	+++	+

Les trois isolats SF10, SFKH4 et SFKH10 coagulent le lait écrémé ce qui se traduit par la production de la coagulase.

La figure 26 et le tableau 9 illustrent l'absence ou la présence de zones d'inhibition des trois isolats en présence d'antibiotiques représentatifs. Les trois isolats sont résistants à l'ampicilline, la cefuroxime et l'amoxicilline (tableau 9). Cependant, ils sont tous sensibles à l'amikacine. La souche SF10 présente le profil le plus résistant, sur les 11 antibiotiques testés seulement deux d'entre eux ont pu inhiber sa croissance. SFKH4 et SFKH10 se sont avérés sensibles à plus de trois antibiotiques. Les plus grandes zones d'inhibition ont été enregistrées avec la streptomycine et l'amikacine.



Figure 26 : photographies de la sensibilité/résistance des souches SF10, SFKH4, SFKH10 aux antibiotiques.

Tableau 9 : résultats de la sensibilité aux antibiotiques.

Antibiotique (mg/ml)	zone d'inhibition (mm)		
	SF10	SFKH4	SFKH10
Amikacine (30)	22	28	25
Spiramycine (100)	0	33	16
Erytromycine (15)	0	20	0
Imipenème (10)	24	0	0
Gentamycine (10)	0	0	15
Ampicilline (10)	0	0	0
Acide Nalidixique (30)	0	17	0
Cefuroxime (30)	0	0	0
Streptomycine (10)	0	22	26
Amoxicilline (30)	0	0	0
Fosfomycine (50)	0	0	0

4.5. Caractères biochimiques

Les trois isolats d'actinobactéries diffèrent par leurs capacités à utiliser les différentes sources de carbone (tableau 10). Tous les isolats sont capables d'utiliser le glucose, le galactose, le maltose et le fructose comme seule source de carbone. Alors qu'ils sont tous incapables d'assimiler le propionate de sodium et le succinate de sodium. L'isolat SFKH10 assimile dix sources de carbone sur les treize sources testées, il présente la meilleure croissance avec le saccharose comme seul source de carbone. L'isolat SF10 n'utilise que huit sources. Cependant, l'isolat SFKH4 assimile, seulement, trois sources de carbone avec une croissance abondante pour le D fructose et le D-maltose.

Tableau 10 : utilisation des sucres par les isolats étudiés.

	SF10	SFKH4	SFKH10
D-glucose	+++	++	+
Lactose	+	-	+
Cellulose	-	-	-
Arabinose	+	-	+
D-xylose	+	-	+
Saccharose	-	-	++++
D-fructose	++	++++	+
D-maltose	++	++++	++
D-galactose	+	±	+
D-ribose	±	-	+
Sorbitol	-	-	±
Inositol	±	-	+
Mannitol	+	-	-
Propionate de sodium	-	-	-
Succinate de sodium	-	-	-

(-) : pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) bonne croissance, (++++)
très bonne croissance.

La souche SFKH10 assimile tous les acide aminées à l'exception de la tyrosine, tandis que les souches SFKH4 et SF10 n'utilisent que cinq sources d'azotes avec une croissance variant de modérée à abondante (tableau 11).

Tableau 11 : utilisation des composés azotés organiques.

	SF10	SFKH4	SFKH10
Asparagine	+	+	±
Méthionine	-	±	±
Acide aspartique	++	-	±
Cystéine	-	-	++
Tyrosine	+++	+	-
Arginine	-	+	++
Proline	++	+	+
Glycine	+	+	±
Tryptophane	-	-	+

(-) pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante, (+++) croissance très abondante.

Tous les souches hydrolysent la gélatine et ne dégradent ni la caséine ni l'adénine. Le tween 80 a été dégradé seulement par la souche SFKH4. La souche SF10 dégrade seulement la gélatine (tableau 12). Les isolats SFKH4 et SFKH10 produisent des endocellulases et seulement la souche SFKH10 présente une activité pectinolytique.

Tableau 12 : activité hydrolytique des isolats.

	SF10	SFKH4	SFKH10
Amidon	-	++	++
Caséine	-	-	-
Gélatine	++	+	++
Adénine	-	-	-
Tween 80	-	+	-
Tyrosine	-	-	++
Pectine	-	-	+
Cellulose	-	+	+

(-) pas de dégradation, (±) dégradation faible, (+) dégradation modérée, (++) dégradation forte.

La souche SFKH10 produit de l'H₂S dans le milieu TSI. Cette production se traduit par l'apparition des colonies noires. Par contre, les souches SFKH4 et SF10 ne présentent aucune production d'H₂S.

Les trois isolats ne dégradent pas la chitine. L'isolat SFKH10 a montré des réactions positives pour son activité nitrate réductase après 5, 10 et 14 jours d'incubation par contre les souches SFKH4 et SF10 ne sont pas dotés cette activité.

4.6. Étude phylogénétique

Les produits de la PCR de l'ADNr 16S, de 1500 paires de base, obtenus par les amorces universelles F27 et R1492 des trois isolats sont séquencés et comparés avec ceux d'autres espèces de la base de données GenBank. Les trois isolats sont très proches entre eux, 97% de similarité entre l'isolat SF10 et SFKH10. Alors que 96% de similarité entre SF10 et SFKH4. L'affiliation phylogénétique des trois isolats est présentée dans le tableau 13.

L'alignement des séquences obtenues par le blast a permis de rattacher, ces isolats au genre *Streptomyces*, ce qui confirme les résultats des caractéristiques culturelles, de la morphologie, de la micromorphologie et de la chimiotaxonomie.

Une similitude de 99,8% a été obtenue entre la séquence de la souche SF10 et la souche type *S. youssoufiensis*. Par ailleurs, l'isolat SFKH10 présente une homologie de 99% avec la souche *S. coeruleorubidus*. Une homologie de 99% a été obtenue entre la séquence de la souche SFKH4 avec la souche type *S. spororaveus*.

L'étude moléculaire est complétée par la construction d'un arbre phylogénétique, regroupant les séquences des trois isolats ainsi que celles des souches de références obtenues par le BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) (figure 27). Il ressort de l'arbre obtenu que la souche SF10 est également très proche aux autres espèces (*S. zagrosensis* et *S. mutabilis*). L'isolat SFKH4 occupe une ligne phylogénétique indépendante des autres souches étudiées (SF10 et SFKH10).

Tableau 13 : affiliation phylogénétique des trois isolats (paire d'amorces universelle).

Souches	Numéro d'accession	Identité (%)	Espèce proche	Numéros d'accession des souches les plus proches
SF10	KU373054	99,8%	<i>S. youssoufiensis</i>	NR116980
SFKH4	KX575868	99%	<i>S. spororaveus</i>	FN646652
SFKH10	KU373055	99%	<i>S. coeruleorubidus</i>	KF991647

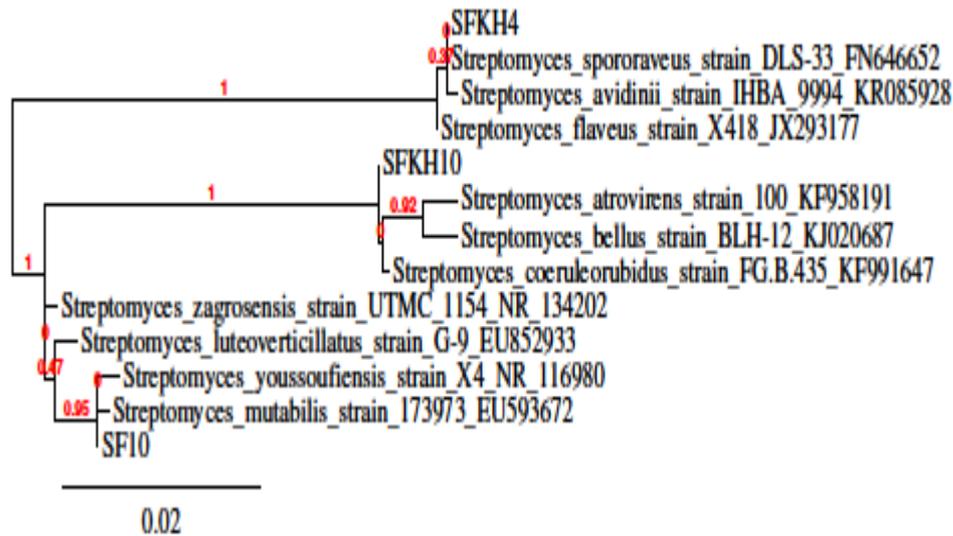


Figure 27: arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour l'ARNr 16S montrant les positions taxonomiques des souches SF10, SFKH4 et SFKH10. Le nombre au-dessous de la barre d'échelle est le nombre de substitutions par site. Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par Bootstrap.

Discussion

Les actinobactéries sont des micro-organismes capables de coloniser différents écosystèmes grâce à leur caractéristique compétitive. Le nombre des actinobactéries est très différent d'un site à un autre et qui peut être influencé par la disponibilité de la matière organique essentielle pour leur croissance. Dans ce travail, l'isolement des actinobactéries a été réalisé à partir d'un sol rhizosphérique et d'un sol montagneux provenant de la région de Khenchela et du sol environnant la Sebka (wilaya de Oum El Bouaghi). Cette variation des sites de prélèvement a pour but d'augmenter nos chances d'isolement d'actinobactéries possédant, éventuellement, un potentiel élevé de production de molécules bioactives.

En effet, ce biotope, semi-aride, qui se trouve touchée par une sécheresse, n'a pas été largement exploré. Cependant, la richesse et la diversité de sol rhizosphérique (wilaya de Khenchela) en actinobactéries a, déjà, été rapporté par Aouar *et al.* (2012) et qui ont montré, en outre, que de nombreuses actinobactéries sont dotées d'une activité antimicrobienne.

Les échantillons prélevés à partir de trois sols, nous ont permis de récolter 99 isolats présentant les caractéristiques culturelles et morphologiques des actinobactéries. Le milieu Olson, employé s'est avéré efficace pour l'isolement de ces bactéries. Ce milieu contient des quantités suffisantes de caséinate de sodium et d'asparagine favorisant la croissance des

actinobactéries. L'importance de ce milieu a été, également, constatée par Hilalli *et al.* (2002), qui ont démontré que c'est le milieu le plus favorable pour la sélection des actinobactéries à partir du sol.

Puisque les actinobactéries sont souvent en interaction compétitive avec d'autres microorganismes du sol, les milieux d'isolement doivent être destinés à réduire le développement de ces microorganismes sans affecter celui des actinobactéries (Hayakawa, 2008). L'addition au milieu d'isolement des substances inhibitrices tels que la nystatine et la polymexine permet de stopper la croissance des germes envahisseurs et de diminuer fortement le nombre de bactéries non mycéliennes indésirables. Williams et Davies, (1965) ont étudié l'effet de la nystatine sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il a inhibé leur croissance en à partir d'une concentration de 50 µg/ml.

Une distribution hétérogène des actinobactéries isolées à partir de chaque échantillon est observée. La température du sol, le type du sol, la végétation et l'emplacement géographique influence fortement la distribution des actinobactéries dans un écosystème (Adegboye *et al.*, 2012). Le sol rhizosphérique de pins d'Alep de la forêt de Khenchela constitue une niche écologique favorable au développement des actinobactéries traduit par le nombre élevé des isolats obtenus. Ce nombre d'actinobactéries, cultivables, est en accord avec celui rapporté par Crawford *et al.* (1993). Ils ont noté une différence importante en nombre d'actinobactéries d'un sol rhizosphérique par rapport à un sol non rhizosphérique. Ceci pourrait être dû à la richesse des exsudats racinaires en composés organiques. Ces derniers favorisent la multiplication des bactéries, ainsi les actinobactéries et surtout le genre *Streptomyces* en ont bénéficié. Cependant, le nombre d'isolats obtenu dans notre étude reste inférieur à celui obtenue par Loqman *et al.* (2009) au Maroc (142 isolats) et Jiménez-Esquilin et Roane, (2005) aux États-Unis (122 isolats).

Un nombre très faible d'isolats a été obtenu à partir du sol montagneux. Ce nombre est considéré très inférieur comparativement avec celui obtenu par Tara *et al.* (2009) qui ont obtenu 79 isolats à partir d'un échantillon de sol montagneux (site de Kalapatthar).

Le sol environnant de la Sebkhha nous a donné également un nombre très réduit d'isolats. Notre résultat différent de ceux obtenus par Meklet *et al.* (2011) qui ont obtenu 52 isolats à partir des échantillons collectés de diverses régions sahariens salines. Alors que

Messoudi, (2013) a isolé 18 souches, seulement, d'actinobactéries à partir de la Sebkha de Kenadsa, située dans le sud-ouest de la wilaya de Béchar.

L'activité antimicrobienne des isolats purs a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette étude a démontré la capacité des isolats d'actinobactéries à produire des substances antibactériennes et antifongiques notamment ceux provenant du sol rhizosphérique et du sol montagneux. Le pourcentage le plus élevé d'isolats actifs est celui des isolats provenant de la rhizosphère de pins d'Alep. Ceci pourrait être expliqué par la relation symbiotique existant entre les actinobactéries et les plantes particulièrement avec leurs racines. Les actinobactéries colonisent les racines des plantes, en influençant positivement via la synthèse de molécules bioactives (antibiotiques ou antifongique) qui vont protéger la plante d'agents phytopathogènes. En contrepartie, les exsudats racinaires de la plante permettent aux souches d'actinobactéries de se bénéficier d'un apport en substrats carbonés (Bosso *et al.*, 2012).

En effet, la rhizosphère du sol forestier a déjà fait l'objet d'un isolement d'actinobactéries par Thakur *et al.* (2007) à partir de laquelle ils ont obtenu 110 souches dont 65 ont une activité antibactérienne, 47 ont une activité antifongique. Malgré que très peu d'isolats d'actinobactéries provenant du sol montagneux, certains d'entre eux présentent une activité antibactérienne et/ou antifongique intéressantes. Nos résultats sont similaires, en proportion, à ceux de Tara *et al.* (2009) qui ont pu isoler 79 actinobactéries à partir d'échantillon de sol de la montagne « Everest » dont 27 sont dotés d'une activité antibactérienne.

Pour l'échantillon provenant du sol de la Sebkha, l'activité antibactérienne des isolats s'est avérée faible en comparaison avec celle des isolats provenant de sol rhizosphérique et de sol montagneux. Cette constatation diffère de celle rapportée par plusieurs auteurs (McKenzie *et al.*, 2010 ; Mythili et Ayyappa, 2011; Ng et Amsaveni, 2012). Nos résultats sont d'autant plus singuliers en comparaison avec ceux de Messoudi, (2013) qui a, isolé des actinobactéries à partir de sol de la sebkha de Kenadsa où tous les isolats présentent un pouvoir antimicrobien remarquable contrairement aux notre.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de tous les isolats indiquent que la plupart sont plus actifs sur les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *B. subtilis*) que sur les bactéries à Gram négatif (*E. col* et *K. pneumoniae*). En effet, plusieurs chercheurs ont observé la

résistance remarquable des bactéries à Gram négatif par rapport à leurs homologues bactéries Gram positif (Ullah *et al.*, 2012).

Le screening pour le choix des microorganismes dans un but d'extraire leurs molécules bioactives a toujours été une voie, essentielle, pour parvenir à des nouvelles molécules. Ce choix était le plus important dans la majorité des laboratoires qui focalise leur étude sur les nouvelles souches ou récemment identifiées. Pour notre part, nous avons choisi :

-l'isolat SF10 sur la base de son importante activité vis-à-vis des bactéries à Gram positif, souche MRSA et champignons,

-l'isolat SFKH4, la seule qui présente une activité remarquable vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.

- l'isolat SFKH10 a une activité antibactérienne seulement,

La taxonomie des actinobactéries s'est longtemps basée sur les caractéristiques culturelles, macro et micromorphologique, physiologiques, biochimiques et également chimiotaxonomiques pour arriver à une identification au niveau du genre. Les isolats étudiés présentent une croissance sur une large gamme de milieux de culture. Cette croissance est variable en fonction de la composition des milieux de culture étudiés.

Les isolats SF10 et SFKH4 produisent un mycélium aérien d'un aspect poudreux contrairement à l'isolat SFKH10 où son mycélium est cotonneux. La sporulation de nos isolats varie selon le milieu de culture et dans certains cas elle est absente. Du point de vue chimiotaxonomique, la paroi des trois isolats contient l'isomère LL de l'acide diaminopimélique (DAP) et la glycine et ne présente pas de sucres caractéristiques. La paroi cellulaire des isolats étudiés est donc de type I (Zhao *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2010).

La morphologie et la chimiotaxonomie des trois isolats ont permis de les intégrer de manière présumptive au genre *Streptomyces* qui a été proposé pour la première fois par Waksman et Henrici, (1943). Ce genre est généralement décrit comme dominant, notamment, dans les sols riches en matière organique où ils doivent avoir toutes les conditions nécessaires pour leur croissance. Le nombre des espèces de ce genre est en augmentation permanente.

Physiologiquement et biochimiquement, les isolats se sont révélés métaboliquement actifs. Cette activité métabolique s'est traduite d'une part, par la production des pigments et

d'autre part par un certain nombre d'activité comme l'activité amylolytique et cellulolytique notamment pour les isolats SFKH4 et SFKH10 et, également, l'activité pectinolytique pour ce dernier.

L'analyse moléculaire portant sur l'ADN ribosomique 16S des isolats SF10, SFKH4 et SFKH10 a permis de confirmer les résultats des études morphologiques et chimiotaxonomiques quant à leur appartenance au genre *Streptomyces*. Les données phylogénétiques ont permis de rapprocher l'isolat SF10 de l'espèce *S. youssoufiensis* avec un taux de similarité de 99,8%. *S. youssoufiensis* est une espèce récemment isolée à partir des mines du phosphate situées à Youssoufina (Marroc) (Hamdali *et al.*, 2011) et qui également très proche à l'espèce *S. zagrosensis* isolée récemment à partir du sol iranien (Mohammadipanah *et al.*, 2014). L'isolat SF10 possède une chaîne de spore de type rectiflexible, les hyphes sont très abondants, ne produit pas de pigment mélanoidé ou diffusible, ne réduit pas les nitrates et ne produit pas d'H₂S. Il utilise le lactose, l'arabinose, le ribose, le xylose et le fructose comme seule source de carbone. Ces caractéristiques physiologiques et biochimiques sont en commun avec celles de l'espèce *S. youssoufiensis*. En plus de cette dernière, d'autres espèces sont très proches à notre isolat, le tableau 14 présente l'étude comparative avec les souches apparentées.

La souche SFKH4 et la souche type de *S. spororaveus*, toutes les deux développent un mycélium aérien de couleur mauve foncée, hydrolysent la cellulose et l'amidon mais sont incapable d'hydrolyser la caséine. Selon les données de Goodflow *et al.* (2012), les deux souches assimilent le glucose et le maltose mais pas le xylose et l'arabinose.

L'isolat SFKH10 a été identifié, à l'espèce *S. coeruleorubidus*. Cet isolat possède un mycélium de substrat jaune brun et un mycélium aérien de couleur bleue ; les chaînes de spores sont de forme spirale. Il produit un pigment mélanoidé mais pas de pigments diffusibles, réduit les nitrates et produit l'H₂S. Il utilise l'arabinose, le xylose, le saccharose, l'inositol, le mannitol comme seule source de carbone et incapable de croître en présence de cellulose comme seul source de carbone. La majorité des caractères phénotypiques de l'isolat SFKH10 sont en commun avec l'espèce la plus reliée phylogéniquement (Karwowski *et al.*, 1988 ; Whitman *et al.*, 2012).

Tableau 14 : quelques caractéristique physiologiques de l'isolat SF10 (1) et ses souches apparentées.

Caractéristiques	1	2	3	4	5	6
Mycélium aérien	Jaune	Blanche	Vert	verdâtre - pâle	Jaune- marron	marron-beige
Mycelium de : substrat	beige	beige	Jaune- marron	Marron- beige	Gris	Jaune-marron
Production de pigment diffusible	-	-	+	+	+	+
Production de pigment mélanine	-	-	-	+	-	±
Utilisation de :						
Arabinose	+	-	-	+	-	+
Lactose	+	+	-	+	-	-
Inositol	±	-	-	+	+	+
Xylose	+	-	+	-	+	-
Croissance en 7 % de NaCl	±	+	-	-	-	-

Souche: 1, SF10; Souche : 2, Streptomyces youssoufiensis, Souche 3 : Streptomyces varsoviensis DSM 40346T; 4, Streptomyces coeruleus DSM 40146T; 5, Streptomyces ramulosus DSM 40100T; 6, Streptomyces kasugaensis DSM 40819T. + : Positif /bonne utilisation ; ± : faible; - : négative/aucune utilisation.

Après identification polyphasique, les trois isolats sont notés ainsi : *Streptomyces youssoufiensis* SF10, *Streptomyces spororaveus* SFKH4 et *Streptomyces coeruleorubidus* SFKH10.

Le genre *Streptomyces* est considéré comme une des sources principale des métabolites secondaires, notamment les antibiotiques. Ce qui explique sa capacité à coloniser différents environnements. Ainsi, l'exploration des écosystèmes extrêmes ou peu exploité est une approche intéressante pour obtenir de nouvelles espèces potentiellement cultivables et sources de biomolécules actives utiles pour différentes applications. Dans la littérature, *S. coeruleorubidus* est un producteur de plusieurs antibiotiques tels que la doxorubicine, epirubicine et daunorubicine (Shang *et al.*, 2008). Pareillement pour *S. spororaveus*, Hojae *et al.* (2015) ont montré sa capacité à produire des substances capables d'inhiber la croissance d'une souche fongique (*Aspergillus flavus*).

Cependant, pour *S. youssoufiensis*, aucune production d'antibiotique par cette souche n'a été signalée pour le meilleur de notre connaissance.

Le chapitre suivant sera consacré à l'extraction, à l'étude chromatographique, à la séparation et la purification des molécules bioactives produites par les trois souches *S. youssoufiensis* SF10, *S. coeruleorubidus* SFKH10 et *S. spororaveus* SFKH4.

Chapitre 2 : Production, extraction et purification des biomolécules produites par les souches *S. youssoufiensis* SF10, *S. coeruleorubidus* SFKH10 et *S. spororaveus* SFKH4.

L'étude des antibiotiques produits par les actinobactéries et notamment le genre *Streptomyces* ne pose pas de grandes difficultés lorsqu'ils sont extraits, purifiés en quantité suffisante pour les seuils de détection des appareils de mesure. Cependant, leurs purifications et leurs identifications deviennent complexes et délicates lorsque les souches produisent plus de 7 molécules à la fois.

Il est à noter que la succession des étapes de purification des biomolécules issues des fractions riches entraîne, automatiquement, une diminution de leurs quantités. Afin de faire face à ces difficultés, la culture à grand échelle semble nécessaire afin d'obtenir des quantités suffisantes en molécules intéressantes. De plus, la purification d'une substance naturelle nécessite souvent une extraction avec un solvant organique approprié qui peut fournir un meilleur rendement d'extraction.

Dans cette étude, les souches *S. youssoufiensis* SF10, *S. coeruleorubidus* SFKH10 et *S. spororaveus* SFKH4 sont dotés d'un large spectre d'activité antimicrobienne. En effet, ces derniers agissent sur toutes les bactéries à coloration de Gram positive testées et sur les deux souches fongiques. À l'exception, de la souche *S. spororaveus* SFKH4, tous les isolats, même ceux qui ne sont pas retenus dans cette étude, sont inactifs contre les bactéries à Gram négatif testées, à savoir *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Les souches *S. youssoufiensis* SF10, *S. coeruleorubidus* SFKH10 et *S. spororaveus* SFKH4 ont été retenus pour étudier les molécules antibiotiques qu'ils produisent.

La souche *S. youssoufiensis* SF10 a fait, de notre part, l'objet d'une attention particulière car dans la littérature, il n'y a pas des données concernant ses métabolites au vu de l'identification récente de cette espèce (Hamdali *et al.*, 2011).

Matériel et méthodes

1. Extraction à grande échelle des molécules bioactives produites par les trois souches

En milieu Bennett gélosé, réparti en boîtes de Pétri, les trois isolats sont ensemencés en stries serrées, 200 boîtes pour chaque souche ont été, ainsi, traitées. Après incubation à 30

°C pendant 7 jours, la gélose est fragmentée puis additionnée d'acétate d'éthyle (choisi comme meilleur solvant). La macération est réalisée, 3 fois, afin de récupérer au maximum les molécules bioactives produites.

Les extraits bruts sont filtrés puis concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (à 40C⁰), puis repris dans 1ml de méthanol dans le but de rechercher leurs activités antimicrobiennes par la technique de diffusion des disques de papier. Les extraits sont, par la suite, analysés par spectroscopie UV-Visible et par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN) ¹H) après leurs mise en solution dans du chloroforme deutéré (CDCl₃).

Les extraits bruts bioactifs sont analysés d'une part, par une série de chromatographies sur couche mince (CCM) en gel de silice (Silicagel 60 F254 0,25mm (Merck), élué par une solution de dichlorométhane-méthanol (DCH-MeOH, 9 :1) et une solution d'hexane-acétate d'éthyle (Hex-AcEth, 4 :6) pour l'extrait de l'isolat SF10, le système hexane-méthanol (Hex-MeOH, 7 :3) pour l'extrait provenant de l'isolat SFKH10 et le système (DCH-MeOH, 9 :1) pour l'extrait provenant de l'isolat SFKH4 et d'autre part, en gel de silice greffé sur C₁₈ (Silicagel 60 RP-18 F254S (Merck) et élué par méthanol-eau (MeOH-H₂O, 8 : 2) pour les extraits de trois isolats. La révélation des taches se fait en exposant les plaques à une source de radiation UV de 254nm et de 365nm suivi par la carbonisation à l'acide sulfurique/anisaldéhyde (1g d'anisaldéhyde dans 100 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄). Les spots apparaissent comme suit : une tache après visualisation sous UV si la molécule contient une unité chromophore ; une tache visible à l'œil nu pour les pigments colorés et formation des taches brunes après une réaction d'oxydation.

Les extraits bruts biologiquement actifs des trois souches ont été fractionnés par chromatographie sur colonne en gel de silice élué par un gradient allant de 100% de dichlorométhane jusqu'à 100% de méthanol. Les fractions obtenues ont été testées par leurs activités antimicrobiennes en utilisant la technique de diffusion des disques de papier. Afin de regrouper les fractions identiques, des CCM des fractions ont été réalisés dans les mêmes conditions que les extraits bruts.

2. Test d'activité antimicrobienne

Les extraits bruts et les différentes fractions de ces extraits ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes sur le milieu Mueller-Hinton (annexe 1) par la technique de

diffusion des disques en papier. Le test a été réalisé vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (MRSA), de l'actinobactérie *S. scabies* et du mycète *Fusarium oxysporum*.

Les échantillons sont, d'abord, dissouts dans du méthanol à raison de 0,5 mg/ml, puis 50 µl de chaque échantillon sont déposés dans des disques en papier de 6 mm de diamètre puis séchés totalement à froid à l'aide d'un séchoir. Les disques sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu Mueller- Hinton pour les bactéries, milieu *YMEA* pour *S. scabies* et milieu PDA pour le champignon. Les milieux sont, préalablement, ensemencés par le microorganisme-cible. La lecture des résultats est effectuée après 24h d'incubation pour les bactéries, une semaine pour *S. scabies* et après 14 jours pour le champignon. Des disques témoins, imbibés par le méthanol et l'acétate d'éthyle et séchés dans les mêmes conditions ont été testés et n'ont révélé aucune activité antimicrobienne.

3. Purification des biomolécules produites

3.1. Par la souche *S. youssoufiensis* SF10

L'extrait brut de la souche *S. youssoufiensis* a donné 54 fractions après séparation par chromatographie sur colonne en gel de silice. Toutes les fractions ont été testées pour leurs activités antimicrobiennes. Ainsi, l'extrait brut bioactif et les fractions regroupées (28-34) et (39-41), également, bioactives et montrant des bons signaux après une analyse par RMN ¹H (CDCl₃) et spectrométrie de masse, ont fait l'objet de plusieurs étapes de séparation et de purification par différentes techniques chromatographiques.

a) Chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie préparative (CP)

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale et en phase inverse. Les plaques utilisées en phase normale sont en verre recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 F254 0,25mm (Merck), et celles de la phase inverse ont été recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 RP-18 F254S (Merck). Le développement des plaques a été réalisé dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié.

Pour la CP, la migration est réalisée sur des plaques en verre recouvertes d'un gel de silice Merck Kiesel gel 60 F254 0,5 mm.

b) Chromatographie sur colonne et chromatographie flash (CF)

Les chromatographies sur colonnes ont été réalisées avec plusieurs types de phases stationnaires dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité de l'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

La chromatographie Flash (CF) a été effectuée sous pression avec le gel de silice Merck Si-60 (15–25 µm). Ce qui permet de séparer rapidement et avec une bonne résolution de nombreux produits organiques. Les colonnes ont été remplies par le solvant approprié. Avant l'introduction de l'échantillon à analyser, l'équilibrage de la colonne est nécessaire. Les solvants (Merck, Milan, Italie) ont été utilisés sans aucune purification.

c) Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La CLHP analytique est constituée d'un système de type Merck-Hitachi équipé par une pompe L-6200A Intelligent Pump, un détecteur UV à barrette de diode (DAD, *Diode array detector*) L-4500A et d'une colonne en phase inverse. Les éluants ont été désaérés sous une pression avant utilisation. Les solvants ont été fournis par Sigma Aldrich Europe et Alfa Aesar et sont utilisés sans aucune purification.

d) Analyse de l'extrait brut par micro-CLHP couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'extrait brut issu de la souche *S. youssoufiensis* SF10 a été analysé par *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) sur un spectromètre de masse à trappe d'ions Esquire-Bruker-Daltonics équipé d'une interface *Electrospray Ionisation* (ESI) muni d'une chaîne micro-CLHP (HPLC) Hewlett-Packard HP1100 HPLC-UV *Diode Array System*. La température de la source est de 300 °C.

L'extrait brut est dissous dans le méthanol à raison de 1mg/ml, puis injecté dans une colonne en phase inversée Eclipse HP, Hypersil BDS-C18, 4,6x150mm à un débit de 1ml/min, et élué par deux solvants : solvant A (MeOH-H₂O, 9 :1) et solvant B (MeOH, 100%). Le programme d'élution est le suivant : de 0 à 25min élution par le solvant A et de 25min à 50min élution par le solvant B. Les éluants utilisés ont été additionnés d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1%. Comme contrôle interne, la nigéricine commerciale (Cayman, USA) solubilisée dans du méthanol, est injectée dans la colonne dans les mêmes

conditions que l'extrait brut. Les mesures de masse ont été réalisées en mode positif et négatif sur une gamme m/z de 200 à 900.

3.2. Par la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10

L'extrait brut de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 a donné 18 fractions après séparation par chromatographie sur colonne en gel de silice. Deux fractions bioactives ont subi différentes étapes de purification.

a) Fraction Fr. 12

La fraction Fr. 12, très active a été analysée par RMN ^1H en CDCl_3 et également par LC-MS enregistré sur un spectromètre de masse à trappe d'ions Esquire-Bruker-Daltonics, équipé d'une interface d'ionisation ESI muni d'une chaîne micro-CLHP Hewlett-Packard HP1100 HPLC-UV *Diode Array system*.

La fraction, dissoute dans le méthanol à raison de 1mg/ml, a été injectée sur une colonne Eclipse XDB-C18, 3,5 μ 4,6x150mm en phase inverse, sous un débit de 0,8ml/min en gradient de polarité. Le programme d'élution est réalisé en deux étapes :

-avec la solution A (MeOH- H_2O , 9 :1) pendant 40min ;

-et la solution B (MeOH, 100%) de 40min à 60min.

Les mesures de masses ont été réalisées en mode positif sur une gamme de m/z entre 200-700.

b) Fraction Fr. 18

Suite aux analyses chromatographiques, la fraction Fr. 18, a été soumise à une étape de purification par CF en phase inverse en utilisant le système (MeOH- H_2O) selon le mode par gradient de polarité.

3.3. Par la souche *S. spororaveus* SFKH4

L'extrait actif de la souche *S. spororaveus* SFKH4 a donné 38 fractions après séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice. Deux fractions Fr.15 et Fr.16, montrant une activité intéressante, ont été analysées par ESI/MS en mode positif et par RMN ^1H en utilisant le solvant deutéré CDCl_3 .

Résultats

1. Extraction des biomolécules

1.1. De la souche *S. youssoufiensis* SF10

La culture de la souche *S. youssoufiensis* SF10 a été réalisée sur le milieu Bennett et incubée à 30 °C. L'extrait brut sec d'acétate d'éthyle de 1g obtenu a été testé contre des microorganismes-tests. Celui-ci présente un fort pouvoir inhibiteur vis-à-vis des bactéries à coloration de Gram positive notamment contre une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (MRSA), de l'actinobactérie *S. scabies* et du mycète *Fusarium oxysporum*. En revanche aucune activité n'a été détectée contre la souche *E. coli* (tableau 15).

Tableau 15 : activités biologiques de l'extrait sec brut provenant de la souche *S. youssoufiensis* SF10.

Extrait brut	<i>B. subtilis</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. scabies</i>	<i>F. oxysporum</i> (%I)
Φ(mm)	29	39	-	38	25	35

Les spots obtenus, après CCM en gel de silice et en gel de silice greffé de l'extrait brut sec bioactif, ont été visualisés sous lumière UV à des longueurs d'ondes de 254nm et 365 nm. Par la suite, les spots ont été révélés par une solution anisaldéhyde/acide sulfurique, et puis séchées à 100 °C. Plusieurs bandes de mobilité relatives ont été détectées, montrant une composition assez riche en molécules, certaines étant bien visibles, de coloration jaune, rose, grises et d'autres visibles à la lumière ultraviolette seulement.

Un balayage de l'extrait sec brut bioactif a été effectué entre 190nm et 800nm afin de vérifier la présence de métabolites. Des différents pics d'absorption en fonction de la longueur d'onde ont été observés au niveau de la région 190 à 290nm (Figure 28). Aucune absorption n'a été détectée dans la région 490nm à 700nm. Nous remarquons, aussi, sur le spectre, un léger pic d'absorbance vers 400 nm.

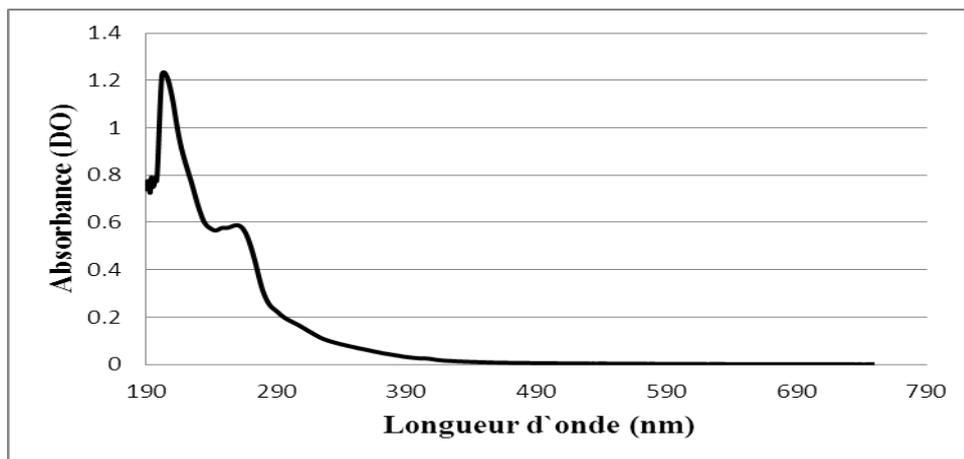


Figure 28 : spectre dans l'UV- Visible de l'extrait brut bioactif dissous dans le méthanol, de la souche *S. youssoufiensis* SF10.

L'analyse de l'extrait brut bioactif de la souche *S. youssoufiensis* SF10 par RMN ^1H a permis de détecter plusieurs signaux (figure 29). Ce qui indique la richesse de cet extrait en molécules bioactives et la capacité de la souche *S. youssoufiensis* SF10 à produire plusieurs molécules à la fois dans le même milieu de culture.

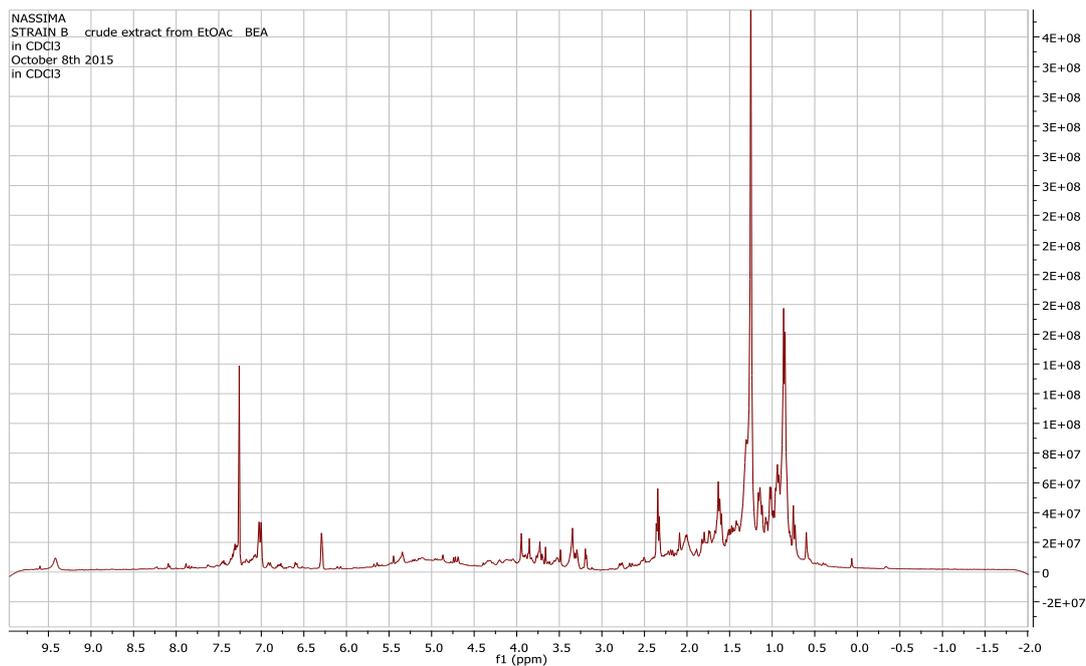


Figure 29 : RMN ^1H (CDCl_3) de l'extrait brut bioactif d'acétate d'éthyle de la souche *S. youssoufiensis* SF10.

La capacité de notre souche *S. youssoufiensis* SF10 à produire des molécules bioactives a été mise en évidence par des analyses de spectrométrie de masse couplée à la micro-CLHP, en utilisant un spectromètre de masse à trappe d'ions Esquire-Bruker-Daltonics équipé d'une interface d'ionisation ESI (électrospray ionisation) muni d'une chaîne micro-CLHP Hewlett-Packard HP1100 HPLC-UV Diode Array system. La figure 30 illustre le profil de l'analyse LC/MS de la souche SF10, comprenant les pics chromatographiques et les spectres de masse qui leur sont correspondant.

Le profil chromatographique révèle la présence de plusieurs pics, correspondant aux différents composés. Deux pics ont été repérés à 11,3 et 12, 2 min. Un autre pic intense a été détecté à 35,3min. La détermination de la nature des pics CLHP obtenus a été réalisée en premier lieu par comparaison des rapports masse/charge (m/z) des différents ions moléculaires $[M+Na]^+$ par rapport aux m/z des ions précédemment décrits dans la littérature et par la comparaison avec une molécule commerciale, la nigéricine, injectée dans les mêmes conditions que l'échantillon naturel. Les deux pics à 11,3 et 12,1 min sont associée à un même signal m/z 747,5 correspond à $[M+Na]^+$ enregistré dans le mode positif . La masse moléculaire a été confirmé par la détection dans le spectre d'un signal à m/z 723 correspond à $[M-H]^-$ enregistré dans le mode négatif. La fragmentation MS/MS (figure 31) de m/z (747,5) a donné un signal à m/z 729,4 correspond à $[M-H_2O +Na]^+$. MS/MS/MS de ce dernier abouti à un signal à m/z 685 qui correspond à une molécule de CO_2 perdu. Ceci signifie la présence d'un groupe carboxyle. Le pic à 11,3 min a été identifié à la nigéricine par la comparaison avec le standard. Le pic à temps de rétention $t_R = 12,1$ min pourrait être un épimère de la nigéricine. Le signal à 35,3min du spectre est associé à un signal MS à m/z 745.

Une analyse par des techniques spectroscopiques serait nécessaire pour déterminer les structures de toutes les molécules détectées.

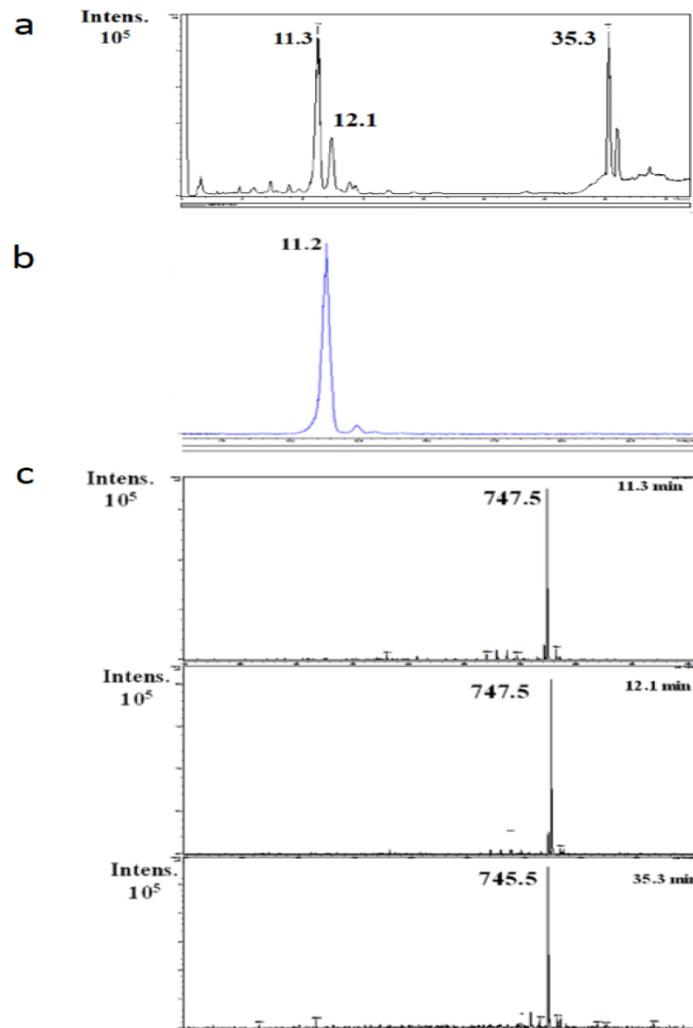


Figure 30 : analyse par micro-CLHP-MS de l'extrait acétate d'éthyle provenant de la souche *S. youssoufiensis* SF10. (a) chromatogramme de l'ion. (b) Le pic à 11,3 min associé à la nigéricine par la comparaison avec le standard. (c) Les signaux en MS enregistrés au mode positif [M+Na]⁺.

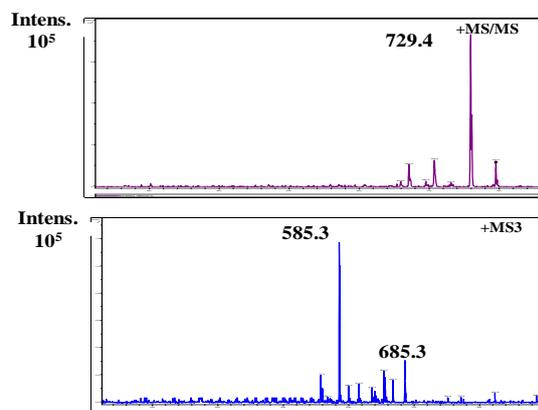


Figure 31 : spectres de masse en tandem MS/MS et MS/MS/MS du l'ion m/z 747, enregistrés en mode positif [M+Na]⁺.

1.2. De la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10

L'extrait sec brut d'acétate d'éthyle de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 montre un fort pouvoir inhibiteur contre les bactéries pathogènes Gram positif (tableau 16). Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 28 à 35mm avec une activité remarquable contre *S. aureus*. Cet extrait ne présente pas d'activité vis-à-vis de la bactérie Gram négatif : *E. coli*. Également, cet extrait n'exerce aucune activité contre le mycète *F. oxysporum*.

Un balayage, de l'extrait sec brut bioactif, a été effectué entre 190 nm et 700 nm. Nous observons différents pics d'absorption au niveau de la région 190 à 390nm (Figure 32). Aucune absorption n'a été détectée au niveau de la région 490nm à 700nm.

L'analyse par RMN ^1H (CDCl_3) de l'extrait brut bioactif provenant de la souche *S. coeruleorubidus* donne un spectre montrant plusieurs signaux (Figure 33). Ce résultat indique la richesse de cet extrait en métabolites secondaires.

Tableau 16: activités biologiques de l'extrait sec brut collecté de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10.

Extrait brut	<i>B. subtilis</i>	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. scabies</i>	<i>F. oxysporum</i> (%I)
$\Phi(\text{mm})$	28	30	-	35	30	-

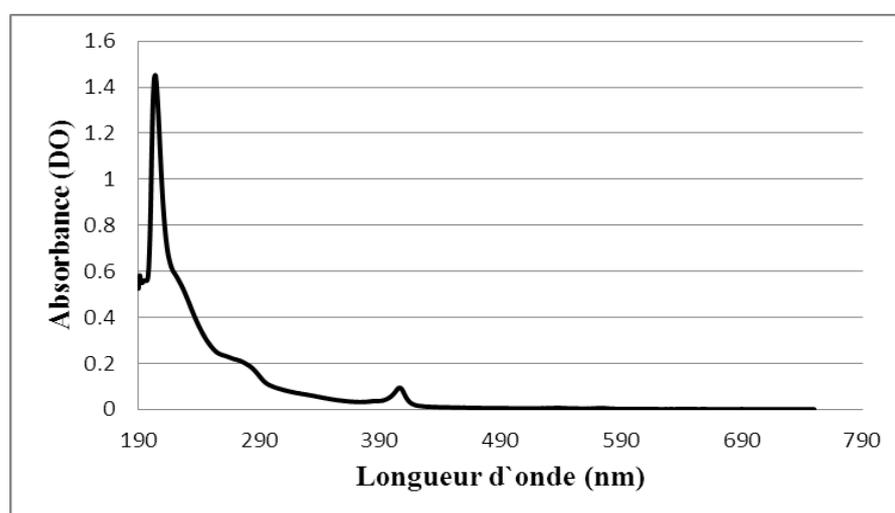


Figure 32 : spectre dans l'UV-visible de l'extrait brut actif dissous dans le méthanol, de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10.

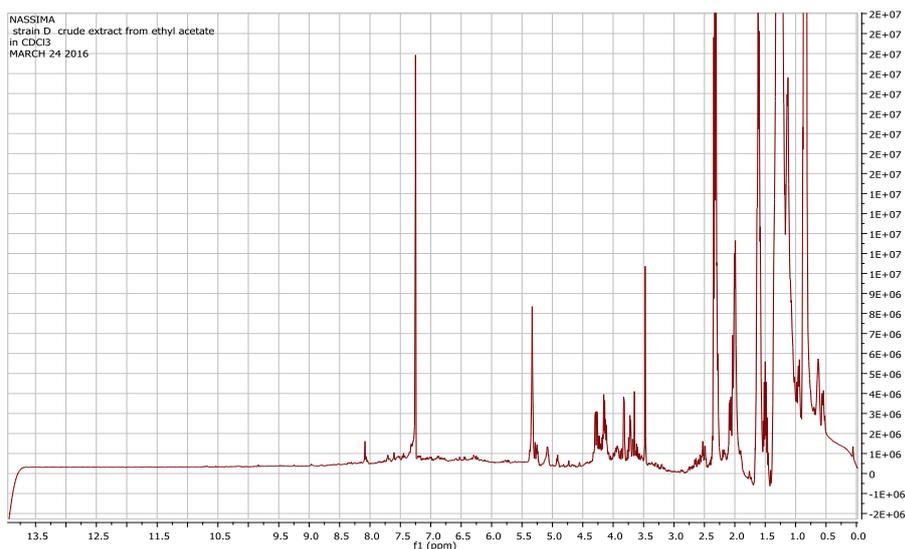


Figure 33 : spectre RMN ^1H (CDCl_3) de l'extrait brut bioactif de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10.

1.3. De la souche *S. spororaveus* SFKH4

L'extrait brut d'acétate d'éthyle de 500 mg provenant de 200 boîtes de Pétri d'une culture de la souche *S. spororaveus* SFKH4 a été concentré à sec à l'évaporateur rotatif à 40 °C, puis repris dans 1ml de méthanol. Son activité antibiotique a été recherchée contre des microorganismes-tests.

Nous observons une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à coloration de Gram positive (tableau 17). Les zones d'inhibition sont moins importantes par rapport à celles détectées avec les extraits provenant des souches *S. youssoufiensis* SF10 et *S. coeruleorubidus* SFKH10. Cependant, une activité importante a été détectée contre *E. coli* avec un diamètre d'inhibition de 20mm.

Tableau 17: activités biologiques de l'extrait brut de la souche *S. spororaveus* SFKH4.

Extrait brut	<i>B. subtilis</i>	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. scabies</i>	<i>F. oxysporum</i> (% I)
Φ (mm)	18	15	20	18	20	25

Un balayage, de l'extrait brut bioactif, a été effectué entre 190 nm et 800 nm. Nous observons différents pics d'absorption (figure 34) au niveau de la région 190 à 290nm. Aucune absorption n'a été détectée au niveau de la région 300nm à 700nm.

L'analyse de l'extrait actif par RMN ^1H est présentée dans la figure 35. Des signaux ont été détectés mais de moindre intensité par rapport à ceux détectés dans les spectres RMN ^1H des extraits des souches *S. youssoufiensis* SF10 et *S. coeruleorubidus* SFKH10.

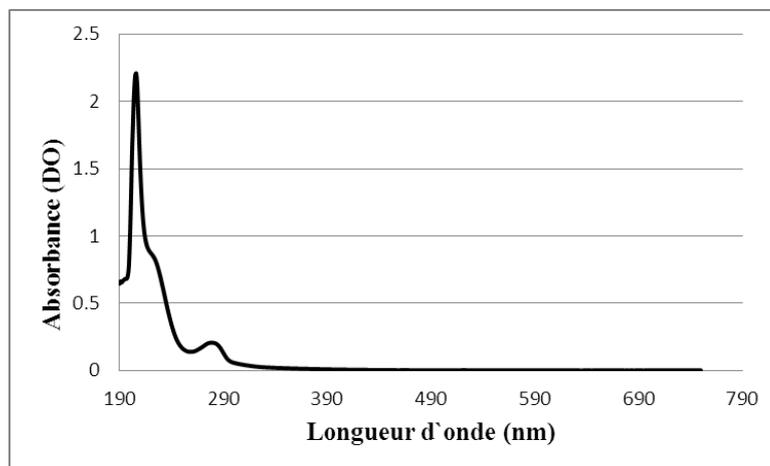


Figure 34: spectre d'absorption dans l'UV-Visible de l'extrait brut bioactif dissout dans le méthanol, de la souche *S. spororaveus* SFKH4.

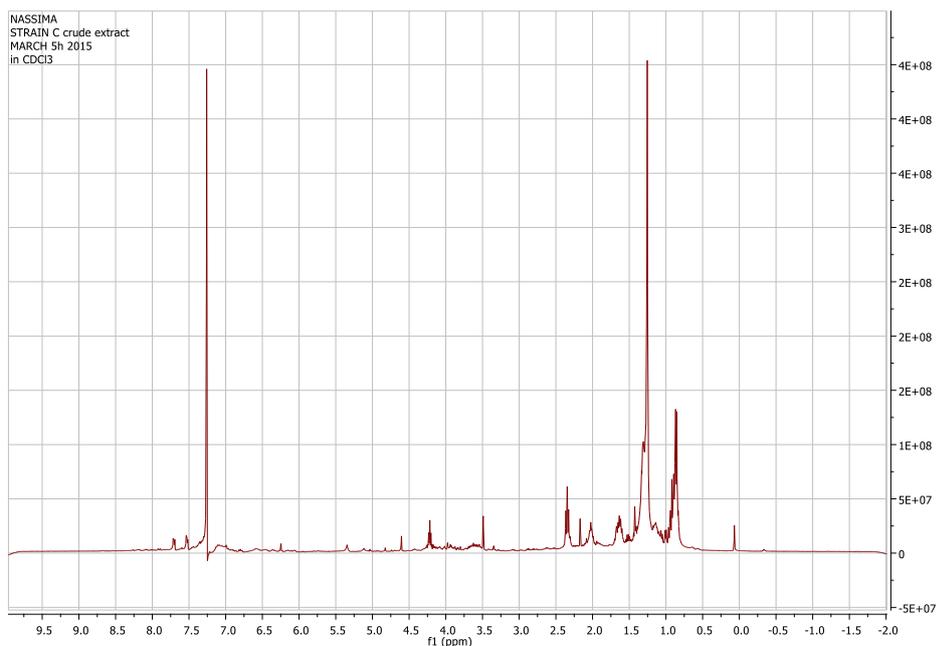


Figure 35 : le spectre RMN ^1H (CDCl_3) de l'extrait brut actif de la souche *S. spororaveus* SFKH4.

2. Purification des biomolécules

2.1. De la souche *S. youssoufiensis* SF10

L'extrait sec bioactif a été dissout dans 1ml du méthanol puis déposée sur une colonne de chromatographie en gel de silice. Cette première étape de purification nous a permis d'obtenir 58 fractions. Les fractions 28 à 42 sont les plus actives, donnant des zones de lyse dont les diamètres varient de 20 à 30 mm (tableau 18). Cette activité est particulièrement importante contre les bactéries à coloration de Gram positive. Une bonne activité a été détectée contre *F. oxysporum*.

Également, ces fractions ont donné des signaux clairs par RMN 1 H (CDCl₃) et par analyse en ESI-MS.

À la suite de la séparation, par CCM, de ces fractions à activité antimicrobienne, les fractions identiques ont été regroupées en deux ensembles : la fraction Fr. (28-34) de 100mg et la fraction Fr. (39-41) de 30mg. Puis ces fractions regroupées ont été testées pour leurs activités antibiotiques et ont subi différentes étapes de purifications.

a) Cas de la fraction regroupée Fr. (28-34)

La fraction regroupée Fr. (28-34) après élution, présente une solution transparente de coloration jaune verdâtre. Cette fraction regroupée (28-34) de 100 mg, étant la plus active, a été le siège de plusieurs purifications successives. Cette fraction après une chromatographie Flash (CF) en phase inverse connectée à une pompe à eau et élution par un gradient de polarité MeOH-H₂O, a donné 23 sous-fractions. En considérant les résultats de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, nous avons retenu 5 **sous-fractions actives**. Chaque sous-fraction, après évaporation du solvant, est re-dissoute dans 1ml de méthanol.

- **La sous-fraction 3 (28-34)**

Cette sous-fraction de 5 mg a subi une séparation par chromatographie préparative en utilisant l'éluant (Hex-Ac Eth, 9,5 : 0,5), obtenant ainsi 5 sous sous-fractions.

La sous sous-fraction active, obtenue, a été purifiée par CF et après élution par un gradient de MeOH-H₂O, 0,5mg de la molécule pure notée **M1** ont été obtenus.

Tableau 18 : activités biologiques des fractions obtenues à partir de l'extrait brut de la souche *S. youssoufiensis* SF10.

Fractions	Système d'éluion	<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. scabies</i>	<i>F. oxysporum</i> (%I)
1-23	100% DCM	-	-	-	-	-
24	99,5 % DCM 0,5 % MOH	10	15	10	20	-
25	98% DCM 2% MOH	15	18	10	-	-
26		-	-	-	-	-
27	96% DCM	21	19	15	15	-
28	4% MOH	30	30	20	22	40
29		30	31	24	20	-
30		30	32	25	-	35
31		31	33	26	-	30
32		25	25	28	18	35
33		25	25	22	30	-
34		27	32	26	28	20
35		27	28	24	20	-
36	94% DCM	27	32	25	21	12
37	6% MOH	28	35	26	27	-
38		29	30	21	20	19
39		20	29	22	35	15
40		20	24	18	10	-
41		15	23	20	10	-
42	92% DCM - 8% MOH	22	20	20	15	10
43		15	15	17	20	-
44		20	23	16	25	-
45	85% DCM	18	16	20	20	-
46	15% MOH	10	10	18	-	-
47		10	18	-	-	-
48		-	10	17	-	-
49	80% DCM 20% MOH	-	-	11	-	-
50	75% DCM 25% MOH	-	-	9	-	-
51	65% DCM 35% MOH	20	25	-	-	-
52		-	10	16	-	-
53	50% DCM	11	20	-	10	30
54	50% MOH	15	15	10	15	-
55	20% DCM	10	10	12	-	-
56	80% MOH	-	-	8	-	-
57-58	100% MOH	-	-	-	28	-

- **La sous-fraction 9 (28-34)**

La sous fraction Fr. 9 (28-34) de 4 mg a été purifiée directement par CLHP en utilisant la colonne Luna RP18 5u C18 (2) 100A, 250X460nm, 5 micron à un débit de 1ml/min, système d'élution (MeOH-H₂O, 1 :1). La détection est réalisée avec le détecteur DAD à 254 nm.

Le chromatogramme obtenu a donné plusieurs pics dont deux sont bien définis et développés et leurs temps de rétention, respectifs, sont de 3 et 15 minutes. Les deux pics sont collectés séparément, concentrés puis testés pour leur activité biologique. La molécule bioactive correspondante est nommée **M2**. La quantité obtenue de cette molécule est de 0,6mg et de tR= 15 min.

- **La sous-fraction 10 (28-34)**

Après concentration, cette sous-fraction de 4,3mg, biologiquement active, renferme un produit majoritaire qui absorbe sous une longueur d'onde de 254 nm. Ce dernier a été purifié par une CLHP en phase inverse sur une colonne RP18, Luna. L'élution a été réalisé par le (MeOH-H₂O, 6 :4). En donnant ainsi, la molécule **M3** pure de 1,2 mg et de tR=5,5 min.

- **La sous-fraction Fr. 17-18 (28-34)**

La sous-fraction Fr.17-18 (28-34) de 26,5mg a été purifiée par CP avec élution par le système hexane-isopropanol (Hex-Isop, 92 :8). Deux molécules pures actives ont été collectées. Ces deux molécules pures isolées n'absorbent pas sous rayonnement UV. Elles apparaissent, après révélation, à base d'acide sulfurique sous forme de deux spots de couleur marron foncée.

Ces deux molécules sont notées **M4** et **M5**. Les quantités obtenues sont, respectivement, 18mg et 6,5mg.

- **La sous-fraction 20-23 (28-34)**

Après une CCM de cette sous-fraction de 19mg éluee par le système (DCH-MeOH, 9 :1), deux spots ont été observés avec une coloration jaune après carbonisation. Cette fraction a été analysée, également, par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (DAD : *Diod array detector*) et à un détecteur évaporateur à diffusion de lumière (acronyme en anglais ELSD, *Evaporative light scattering detection*) CLHP/DAD-ELSD en phase inverse en utilisant une colonne Luna C₁₈ (2) 100 A

(250 × 460 mm) 5 μ , à un débit de 1ml/min, système d'élution (MeOH-H₂O, 97 : 3). Le chromatogramme obtenu a montré la présence de deux pics bien définis ayant des temps de rétention de 15 et 19min (Figure 36). Une CLHP en phase inverse sur une colonne RP18, Luna, a été effectuée. L'élution a été réalisée par le (MeOH-H₂O + TFA 0,1%, 9 : 1) de 0 à 25min et (MeOH + TFA 0,1%) de 25 à 40min. En donnant ainsi, la molécule **M6** pure de 10 mg et de t_R=35,3 min.

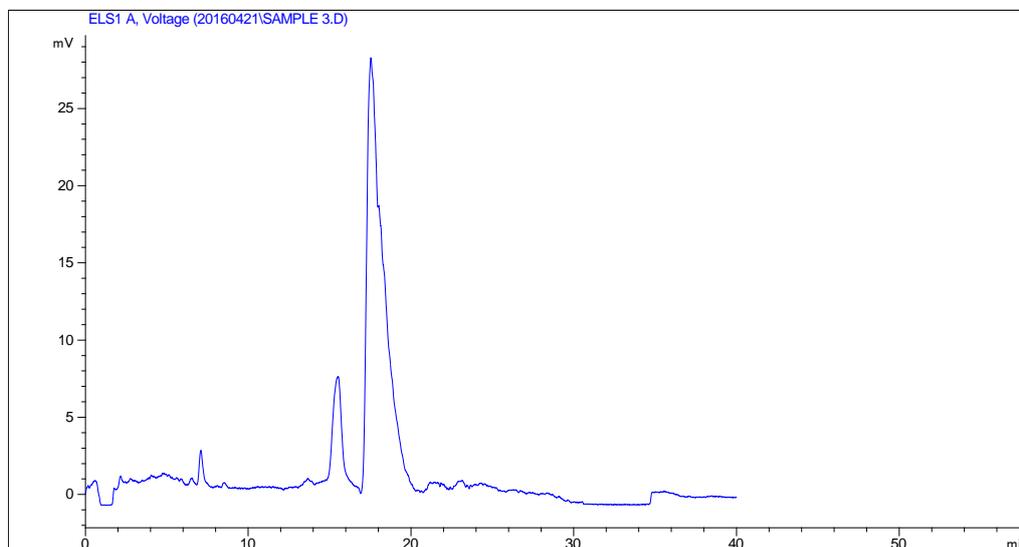


Figure 36 : chromatogramme de la fraction active 20-23 analysé par CLHP-DAD-ELSD.

b) La fraction regroupée (39-41)

La fraction Fr. (39-41) de 30mg a été purifiée, en premier lieu, par CF en phase inverse élue par un gradient de polarité en utilisant le système (MeOH-H₂O). Une deuxième purification a été réalisée par CP et élution par le système (DCH-MeOH, 9 : 1) ; obtenant 0,6mg d'une molécule pure, notée **M7**.

En conclusion, la pureté des molécules M1, M2, M3, M4, M5, M6 et M7 a été confirmée, en dernier ressort, par CLHP en phase inverse en utilisant la colonne Luna. La stratégie globale adoptée pour la purification des quatre molécules bioactives (**M3**, **M4**, **M5** et **M6**), considéré comme des composés majoritaires de la souche *S. youssoufiensis* SF10, est schématisée dans la figure 37.

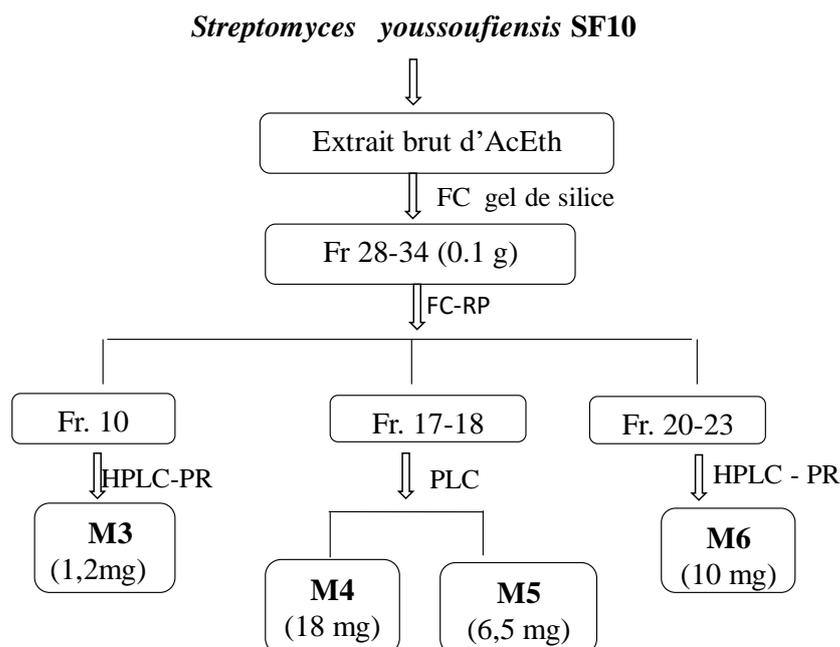


Figure 37 : schéma de purification de métabolites présents dans l'extrait brut bioactif de la souche *S. youssoufiensis* SF10.

2.2. De la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10

L'extrait brut a été fractionné à l'aide d'une chromatographie sur colonne, 18 fractions ont été collectées et leurs activités antimicrobiennes ont été recherchées contre les bactéries-tests. A l'exception de la fraction Fr. 15, les fractions jaunes et rouges comprises entre 11 et 18 montrent une bonne activité vis-à-vis de tous les bactéries-tests à savoir, *S. aureus*, MRSA, *Bacillus subtilis* et *S. scabies* (tableau 19). Les zones d'inhibitions varient entre 12 et 30mm.

Deux fractions bioactives (Fr. 12 et Fr. 18), sélectionné sur la base de leur activité intéressantes, ont fait l'objet d'une étude chromatographique.

Tableau 19: activité des fractions en (mm), obtenues par chromatographie sur colonne, de l'extrait brut bioactif provenant de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10.

Fractions	Système d'éluion	<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. scabies</i>
1	100 % DCM	-	-	-	-
2	90 % DCM 10 % MOH	-	-	-	-
3	80% DCM 20 % MOH	20	15	18	20
4		10	15	10	18
5-8	50% DCM	-	-	-	-
9	50 % MOH	12	11	18	20
10		-	-	-	-
11		12	18	17	19
12		20	28	30	30
13	25% DCM	25	28	22	25
14	75 % MOH	20	24	22	25
15		-	-	-	-
16		10	14	14	20
17		28	22	10	10
18	100% MeOH	30	25	28	25

a) Fraction Fr. 12

Le spectre RMN ^1H de la fraction Fr. 12 de 23mg présente de plusieurs signaux, indiquant la richesse de cette fraction en molécules (Figure 38). Cette fraction a été également soumise à une analyse par LC/MS. Le chromatogramme obtenu montre quatorze pics selon leur temps de rétention (Figure 39). Ce qui montre la richesse de cette fraction en molécules qui peuvent être responsable de l'activité antibactérienne.

Les ions détectés par LC-MS pour cette fraction sont de haut m/z (le plus souvent supérieure à m/z 500), ce qui indique que l'activité serait plutôt due à des molécules d'antibiotiques très complexes.

Trois pics ont le même ion (m/z 677,5) et le même fragment (m/z 622) ayant cependant, des temps de rétention différents (tableau 20). Ces pics correspondent, probablement, à des molécules isomères. Leur séparation va être difficile.

La richesse de cette fraction en molécules, explique l'importance des zones d'inhibitions obtenues. En fin de compte, **cette fraction n'a pas été retenue, dans cette étude**, au vu des difficultés rencontrées lors de la purification.

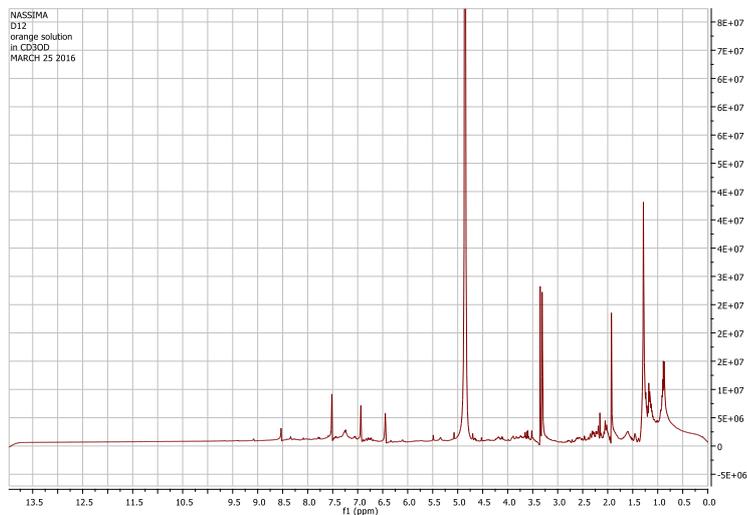


Figure 38 : spectre RMN ^1H (CDCl_3) de la fraction Fr. 12 issue de l'extrait actif de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10.

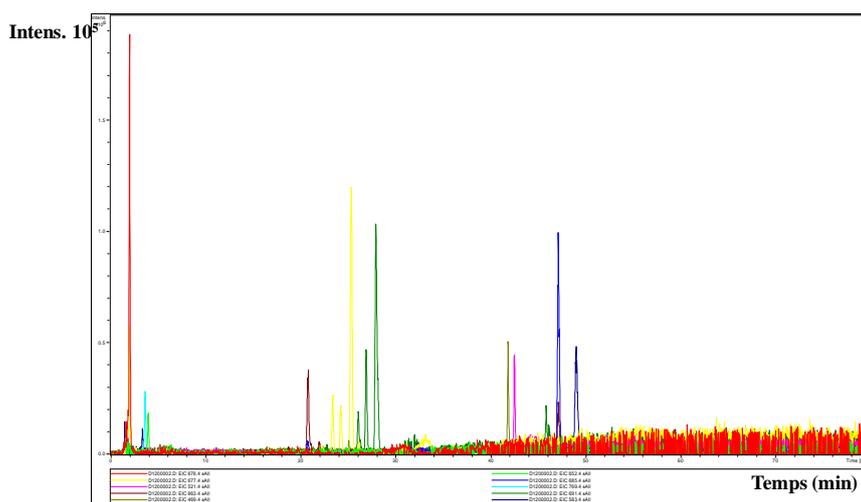


Figure 39 : chromatogramme, de la fraction Fr. 12, obtenu par LC-MS.

Tableau 20 : analyse par LC-MS de la fraction Fr. 12. Les temps de rétention et les masses sont indiqués.

Numéro du pic	Temps de rétention (min)	[M+Na] ⁺ <i>m/z</i>	Fragment
1	2	676,4	603
2	3,7	769,3	622
3	4	652,3	620
4	20,8	663,5	622
5	23	677,5	622
6	24,2	677,5	622
7	25,3	677,5	622
8	26,1	691,5	622
9	26,9	691,5	622
10	27,9	691,5	622
11	47,1	685,5	622
12	41,8	469,6	361
13	42,5	521,6	361
14	49	583,7	361

b) Fraction Fr. 18

La fraction Fr.18 de 20,5mg, a été soumise à une étape de purification par CF en phase inverse en utilisant le système (MeOH-H₂O) selon le mode par gradient de polarité. À la suite de cette analyse chromatographique, **4mg** d'un composé pur noté **C1** ont été obtenus.

2.3. De la souche *S. spororaveus* SFKH4

L'extrait brut a été fractionné par chromatographie sur colonne, 38 fractions ont été retenues et leurs activités ont été recherchées contre les microorganismes-tests. Les fractions actives montrant des diamètres d'inhibition qui varient de 10 à 35mm (tableau 21). Les fractions montrant des activités, à la fois, antibactérienne et antifongique, les plus intéressantes sont Fr. 15 et Fr. 16.

L'analyse de la fraction Fr. 15 par spectrométrie de masse (ESI-MS) montre des pics à *m/z* 685,4 et *m/z* 699 enregistré en mode positif (figure 40). Ces données montrent que l'activité de cette fraction est due à des métabolites de hauts poids moléculaire. De plus, les spectres de masse MS/MS de ces molécules présentent en commun un fragment correspondant à *m/z* 443. Ces molécules sont donc très proches entre elles de point de vue structure chimique.

En ce qui concerne la fraction Fr.16, le spectre de masse montre des pics à m/z 769 et à m/z 777 qui correspondent à l'ion $[M+Na]^+$ enregistré en mode positif (figure 41).

Tableau 21 : activités biologiques des fractions de l'extrait provenant de la souche *S. spororaveus* SFKH4.

Fractions	Système d'éluion	Diamètre d'inhibition (mm)					<i>F. oxysporum</i> (%I)
		<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. scabies</i>		
1-12	100% DCM	-	-	-	-	-	-
13	95 % DCM 5 % MOH	-	15	-	-	-	-
14	80% DCM 20% MOH	20	20	20	-	-	25%
15		20	15	35	28	-	20%
16		30	29	28	25	-	24%
17	70% DCM	-	-	20	22	-	29%
18	30% MOH	20	10	19	-	-	11%
19- 24		-	-	-	-	-	-
25	60% DCM	13	17	8	-	-	18%
26	40%MOH	-	-	-	-	-	-
27		-	12	-	-	-	-
28-29		-	-	-	-	-	-
30	50% DCM	10	11	18	10	-	-
31-33	50% MOH	-	-	-	-	-	-
34		22	20	20	15	-	13%
35-37	25% DCM 75%MOH	-	-	-	-	-	-
38	100% MOH	18	20	30	20	-	14%

Les spectres RMN 1H des fractions Fr. 15 et Fr. 16 (figure 42) présentent une grande similitude et qui révèlent la présence des bons signaux correspondants aux métabolites qui peuvent être responsables de l'activité antimicrobienne.

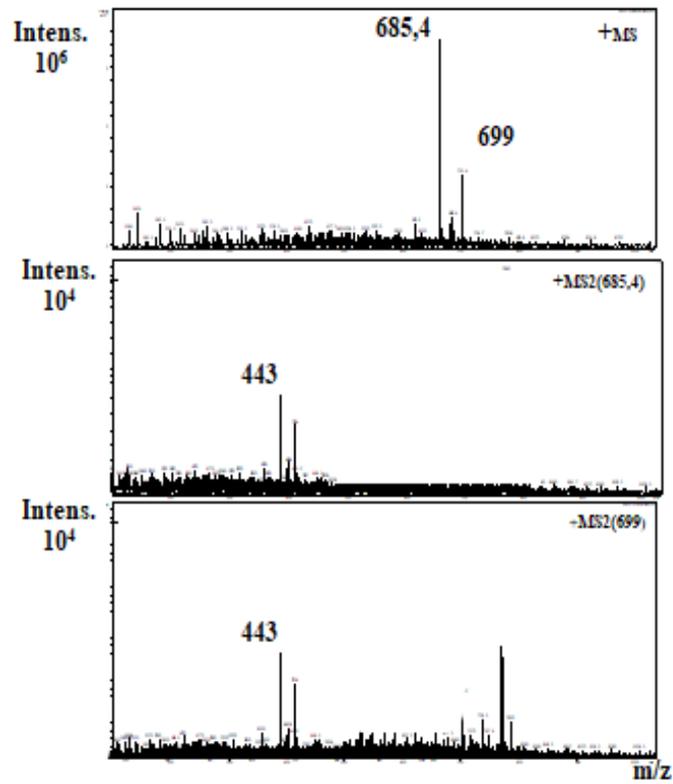


Figure 40 : les signaux de la spectrométrie de masse et masse en tandem MS/MS enregistrés au mode positif $[M+Na]^+$ de la fraction Fr. 15.

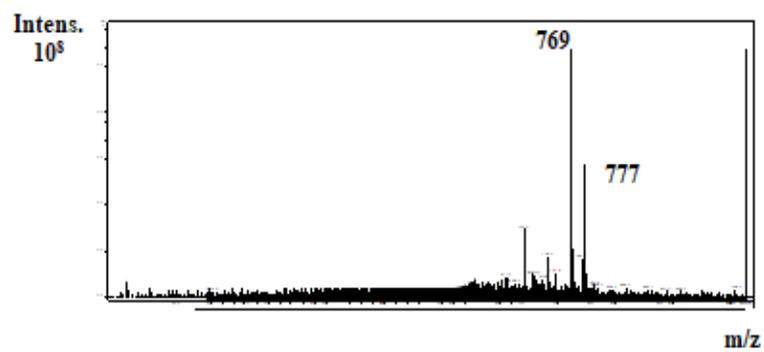


Figure 41 : spectre de masse enregistré au mode positif $[M+Na]^+$ de la fraction Fr. 16 .

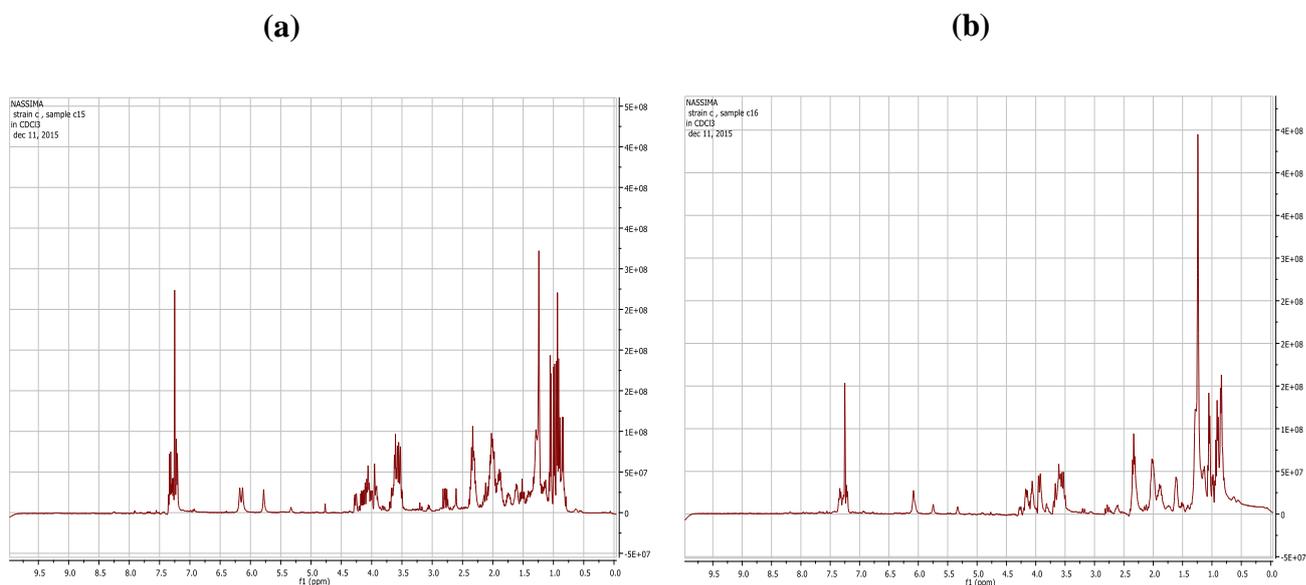


Figure 42 : RMN $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$ de la fraction Fr. 15 (a) et Fr. 16 (b).

Les analyses des fractions Fr.15 et Fr.16 par spectrométrie de masse et par RMN ^1H montrent que les fractions sont riches en métabolites et que leurs purifications sont délicates. Ces deux fractions n'ont pas été retenues pour la suite de notre étude.

Discussion

L'extraction, la séparation et la purification des biomolécules biologiquement actives nécessitent, à la fois, la combinaison de plusieurs techniques et une quantité assez importante d'extrait brut afin d'aboutir à des quantités suffisantes de molécules pures.

Toutes les souches sélectionnées *S. youssoufiensis* F10, *S. coeruleorubidus* SFKH10 et *Streptomyces spororaveus* SFKH4 présentent une activité inhibitrice. Ces mêmes activités sont rencontrées, également, dans les extraits bruts. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les molécules actives produites en milieu solide ont été bien extraites avec l'acétate d'éthyle.

Ce solvant organique a pu solubiliser un nombre important des molécules actives. En effet, plusieurs auteurs ont utilisé l'acétate d'éthyle comme solvant organique pour extraire des biomolécules produites par le genre *Streptomyces* (Djinni *et al.*, 2013 ; Prakasham *et al.*, 2014). De plus, la macération répétitive des géloses s'est avérée efficace pour récupérer le maximum possible de molécules actives.

Il a été montré, également, que l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle du milieu liquide (Bussari *et al.*, 2008). Cependant, il faut prendre en compte que la quantité d'antibiotique extraite est spécifique de chaque souche d'actinobactérie.

En réalité, il n'existe pas de méthode universelle pour extraire les antibiotiques. Parmi les protocoles adaptés pour l'extraction des biomolécules et notamment les antibiotiques, il y a celui de Sallach *et al.* (2016) qui consiste en des extractions à partir de la matrice végétative par lyse cellulaire nécessitant congélation et décongélation, macération mécanique et sonication tissulaire. Li *et al.* (2004) ont montré que l'ultrafiltration de la culture de fermentation, pouvait améliorer de manière significative l'opération d'extraction en termes de séparation des phases, et augmenter la récupération et la qualité des produits retenus.

L'extrait brut d'acétate d'éthyle provenant d'une culture de la souche *S. youssoufiensis* SF10 présente une activité dirigée, surtout, contre les bactéries à coloration de Gram positive, notamment contre *S. aureus* et *MRSA*. Cet extrait, présente également, une activité contre *F. oxysporum*. La même constatation a été signalée par Dhanasekaran *et al.* (2009) qui ont montré qu'un *Streptomyces* sp. secrète un antibiotique à large spectre contre certaines bactéries et champignons pathogènes. En effet, les molécules antifongiques sont très recherchées parce que très peu de molécules sont sur le marché. L'utilisation de micro-organismes antagonistes, notamment le genre *Streptomyces*, est une méthode idéale de lutter contre les phytopathogènes. Un produit commercial contenant *S. griseoviridis*, (Mycostop), a été utilisé comme agent de biocontrôle, en agriculture (Tuomi *et al.*, 2001).

Les souches *S. coeruleorubidus* SFKH10 et *S. spororaveus* SFKH4, très proches taxonomiquement entre elles, sont remarquables pour leur forte activité antibactérienne. L'extrait d'acétate d'éthyle provenant d'une culture de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 sur un milieu solide a montré une bonne activité dirigée contre les bactéries à coloration de Gram positive et n'inhibe pas la croissance de *F. oxysporum*. Par ailleurs, l'extrait organique issu de la souche *S. spororaveus* SFKH4 présente un degré de spécificité élevé et possède un spectre d'action élargie. Il agit sur *B subtilis*, *MRSA*, *S. aureus*, *S. scabies*, *F. oxysporum* et également contre *E. coli*.

La différence de spectre d'action entre les trois souches étudiées, reflète la différence de structure des antibiotiques qu'elles produisent. En effet, les actinobactéries et notamment

le genre *Streptomyces* ont une importante capacité métabolique et produisent des pigments et un grand nombre de métabolites bioactifs de structure chimique différente (Net *et al.*, 2009 ; Patrícia *et al.*, 2010).

L'analyse par CCM a montré que les extraits actifs des trois souches sont riches en métabolites secondaires. Ces trois isolats produisent, chacun, plus de trois molécules d'antibiotique sur le même milieu de culture (Bennett). Selon les spectres RMN ^1H et ceux de l'UV-visible des trois extraits, ces molécules ont des structures très complexes et contiennent des cycles aromatiques avec une faible présence de groupements conjugués.

À notre connaissance, aucune production d'antibiotique par *S. youssoufiensis* n'a été signalée. Cependant, la bioactivité de cette souches vis-à-vis différents micro-organismes tests a été reportée par (Hamdi *et al.*, 2011).

Par contre, l'espèce *S. coeruleorubidus*, représente l'un des plus puissant groupe connu pour être le grand producteur de molécules antimicrobiennes et bien d'autres molécules pouvant présenter un intérêt industriel (Kandula *et al.*, 2013).

L'analyse par LC-MS de l'extrait actif de la souche *S. youssoufiensis* SF10 révèle la présence de deux métabolites détectés comme deux pics correspond au même signal ESI-MS à m/z 747 pour l'ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Ceci signifie qu'il s'agit peut-être d'isomères. Ces derniers correspondent probablement aux molécules actives, ce qui va être confirmé en testant leur activité antibactérienne après la purification. En comparant les résultats de la spectrométrie de masse et de l'analyse par fragmentation, une similarité a été remarquée avec la molécule polyéther, la nigéricine. Le chromatogramme de l'extrait de la souche *S. youssoufiensis* SF10 indique la présence du pic qui a un temps d'élution identique à celui de la nigéricine standard. En effet, LC-MS joue un rôle de plus en plus important dans l'analyse des composés en mélange (Xiao-Bing *et al.*, 2006). Les ions de fragmentation des spectres MS pourraient fournir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus (Pfeifer *et al.*, 2005). Néanmoins, tous ses résultats doivent être vérifiés et complétés en employant des techniques spectroscopiques approfondies. Il est très intéressant de signaler que des pics additionnels ayant de masses proches $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de la nigéricine sont détectés dans l'extrait actif provenant de la souche *S. youssoufiensis* SF10. Ces masses peuvent correspondre à des molécules de la même famille que la nigéricine.

Nous avons mis en évidence les principales fractions actives provenant des extraits des trois souches étudiées. Ainsi, nous nous sommes intéressés, principalement, aux fractions donnant de bons signaux par RMN ^1H ou par ESI/MS.

Pour la souche *S. youssoufiensis* SF10, ces fractions se sont révélées être des complexes de plusieurs antibiotiques et que la majorité de ces derniers n'absorbent pas sous lumière UV. Ceci indique que cette souche a produit des métabolites dans la majorité ne contiennent pas des doubles liaisons. Sept molécules ont été purifiées par différentes technique chromatographiques. En effet, la purification de ces biomolécules était délicate vu la richesse de *S. youssoufiensis* SF10 en fractions actives donc en molécules actives. Notre travail a été, d'autant plus ardu, que dans la littérature, Il n'existe pas une technique unique efficace garantissant l'obtention des molécules qualitativement souhaitées et quantitativement suffisantes. De plus, il est à noter que le processus de la purification adopté pour chaque molécule est en relation étroite avec ses caractéristiques physique et/ou chimique.

Les techniques LC-MS et MS/MS appliquées sur la fraction Fr. 12 provenant du fractionnement de l'extrait actif de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 a permis de déceler la présence des masses $[\text{M}+\text{Na}]^+$ équivalentes et d'autres très proches entre eux, confirmant ainsi la capacité de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10, de produire une large diversité de composants qui peuvent être de nouvelles molécules.

L'étude de la spectrométrie de masse ESI/MS de deux fractions actives (Fr. 15 et Fr. 16) provenant de l'extrait actif de la souche *S. spororaveus* SFKH4, a révélé que cette souche est capable de produire des molécules de haut poids moléculaire. En effet, il a été reporté dans la littérature la capacité des actinobactéries et notamment le genre *Streptomyces* à produire des antibiotiques complexes de poids moléculaire très élevé. (Rateb *et al.*, 2011).

En conclusion, l'extraction et la purification des antibiotiques est, généralement, longue et fastidieuse. Afin d'obtenir un échantillon d'antibiotique suffisant en terme de quantité en vue des étapes ultérieures de caractérisation, il est nécessaire de chercher d'autre techniques d'extraction ou de combiner plusieurs techniques en même temps. Cependant, la méthodologie appliquée dans cette étude, nous a permis de montrer la capacité de trois souches *S. youssoufiensis* SF10, *S. coeruleorubidus* SFKH10 et *S. spororaveus* SFKH4 isolées d'un écosystème terrestre de produire différents métabolites à activité antimicrobienne.

Chapitre 3 : Étude structurale des biomolécules pures produites par les souches *S. youssoufiensis* SF10 et *S. coeruleorubidus* SFKH10

Les quatre molécules pures, à savoir **M3**, **M4**, **M5** et **M6** de la souche *S. youssoufiensis* SF10 ainsi que la molécule **C1** de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10, extraites toutes de fractions bioactives, ont fait l'objet d'études spectroscopiques approfondies. Les molécules M1, M2 et M7 de la souche *S. youssoufiensis* SF10, sécrétées en petite quantité n'ont pu être analysées.

Les deux techniques utilisées, principalement, sont la spectrométrie de masse (SM) (*Mass Spectrometry* = MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui sont des techniques performantes dans la caractérisation des biomolécules organiques naturellement produites. Cette analyse structurale a, également, été complétée par la spectroscopie UV-Visible et Infra-Rouge. Ces dernières, nous ont donné des informations supplémentaires sur la structure des molécules.

Notre objectif, était d'aboutir à identifier la structure de nos molécules pures bioactives.

Matériel et méthodes

1. Test antimicrobien des molécules pures produites par les souches *S. youssoufiensis* SF10 et *S. coeruleorubidus* SFKH10

La mise en évidence de l'activité antibactérienne, des quatre molécules pures secrétées par la souche *S. youssoufiensis* SF10 et de l'unique molécule de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 a été effectuée, par la méthode de diffusion des disques de papier, contre les bactéries-tests : *S. aureus* 25, *Bacillus subtilis* et *S. scabies*.

2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre (*Bruker 400 AVANCE*) opérant à 400 MHz pour le proton et à 100 MHz pour le carbone-13 (figure 43). Les échantillons ont été solubilisés dans le chloroforme deutéré CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,25$ parties par million (ppm) et $\delta_{\text{C}} = 77,0$ ppm). Le chloroforme a été traité par un passage sur l'aluminium basique afin d'éliminer son acidité. Tous les signaux RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été assignés

sur la base des déplacements chimiques (δ), des constantes de couplages (J), des intensités du signal et des expériences par (COSY ^1H - ^1H), (HSQC ^1H - ^{13}C) et (HMBC ^1H - ^{13}C).



Figure 43 : instrument de la résonance magnétique nucléaire (Bruker AVANCE 400), laboratoire de chimie bio-organique, université Trento, Italie.

3. Spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée en utilisant deux instruments. Le choix de chaque instrument dépend de la nature de la molécule à analyser. Les spectres ESI-MS (*electrospray ionisation-Mass Spectrometry*) ont été enregistrés en utilisant un spectromètre de masse de type *Bruker Esquire LC, ion trap mass spectrometer*, équipé d'une source d'ion *electrospray* (ESI) en mode positif ou négatif, par injection d'une solution méthanolique de l'échantillon dans la source. Les données de l'ionisation ont été portées sur un logiciel *Kratos computerized acquisition* : température et voltage de la source sont, respectivement, 300 °C et 32V, l'azote (N_2) comme gaz de nébulisation (*spray*), à raison de 4l/min, et la gamme du balayage $m/z = 100-800$.

La mesure de la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS : *High-resolution mass spectrometry*) a été obtenue par injection directe de l'échantillon, en utilisant un spectromètre de masse de type *Orbitrap Fusion Tribrid®. mass spectrometer*.

4. Spectrométrie de masse en tandem (MS-MS)

La molécule est ionisée soit par addition ou bien élimination d'un proton. Le type d'ionisation dépend de la propriété basique ou acide de la molécule. La fragmentation de la molécule s'effectue par l'Hélium afin d'activer la collision de l'ion primaire sélectionné. La fragmentation sous un apport d'énergie nous donne une indication sur la structure de la molécule recherchée.

5. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ a été mesuré en solution sur un polarimètre de type Bellingham & Stanley Limited ADP 440 *Apparatus* à la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda = 589 \text{ nm}$). La mesure du pouvoir rotatoire ($\text{dm}^{-1} \text{ deg ml g}^{-1}$) a été effectuée selon la formule :

$$[\alpha]_D = \text{obs } \alpha / l c.$$

α = angle de rotation en degrés lu à la température ambiante.

l : est la longueur en décimètres de la cellule de mesure (1dm).

c : la concentration de la molécule chirale dans la solution (g/ml).

6. Spectroscopie UV-Visible

Les spectres ultraviolet et visible des molécules pures ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre Pekin- Elmer Flexar *LC Pump / Flexar PDA Detector*). Les échantillons à analyser sont dissous dans le méthanol puis introduits dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm.

7. Spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier

Les spectres infrarouge (IR) ont été effectués au moyen d'un spectromètre à transformée de Fourier *Transform (FT-IR) Tensor 27 Bruker* à 1 cm^{-1} de résolution. Les échantillons sont dissous dans le méthanol. Après évaporation de ce dernier une très fine couche blanche est obtenue sur l'élément d'analyse. Les spectres IR ont été tracés à l'aide d'un logiciel Opus software package.

8. Etude computationnelle sur les polyéthers épimères (M4, M5, et M6)

Cette étude repose sur le calcul de la théorie de la fonctionnelle de la densité (TFD) (DFT : *Density Functional Theory*) qui représente une approche importante de la mécanique quantique et qui établit que l'énergie d'un système dans son état fondamental est une fonctionnelle de la densité électronique de ce système. En effet, la mécanique quantique décrit la matière comme un ensemble de noyaux atomiques autour desquels gravitent des électrons. Ces calculs de la densité fonctionnelle ont pour objectif de déterminer la configuration la plus stable de la molécule et de déterminer des fonctionnelles qui permettent de donner une relation entre la densité électronique et l'énergie.

Dans ce travail, les structures de base ont été générées par le système mécanique de minimisation moléculaire en utilisant l'ordinateur équipé d'un logiciel Serena Software, version 7.00. Le calcul chimique a été performé à l'aide d'un ordinateur Pentium IV 3.6 GHz en utilisant l'ensemble de programmes Gaussian 03W révision E.01 *package program set* (Frisch *et al.*, 2004). La théorie fonctionnelle de la densité restreinte (DFT) a été utilisée pour l'optimisation de la géométrie en invoquant l'optimisation de la géométrie du gradient.

Les bases sélectionnés étaient 6–31 G (d,p) pour tous les atomes. La DFT à gradient corrigé avec la fonction hybride à trois paramètres (B3) (Becke, 1993) pour la partie d'échange et la fonction de corrélation de Lee-Yang-Parr (LYP) (Lee *et al.*, 1988) ont été utilisées. Les simulations en présence d'eau ont été réalisées en utilisant le modèle *polarizable continuum model (PCM)*. Les paramètres structuraux optimisés ont été utilisés dans les calculs d'énergie vibratoire aux niveaux de la DFT pour caractériser tous les points fixes comme des minima. Pour chaque structure optimisée, aucun mode de nombre d'onde imaginaire n'a été obtenu, ce qui prouve qu'un minimum local sur la surface d'énergie potentielle a effectivement été trouvé. C'est calculs ont été réalisés avec l'aide du Dr. Andrea Dephant. (Laboratoire de chimie bio-organique, Université Trento, Italie).

Résultats

1. Activité antibactérienne des molécules pures

Toutes les molécules pures inhibent la croissance de toutes les bactéries-tests. Les molécules M4 et M6 ont donné les meilleures zones d'inhibition, particulièrement, contre *S.*

aureus 25 (tableau 22). La molécule C1 a montré également une bonne activité vis-à-vis *S. aureus* et *S. scabies*.

Tableau 22 : activité antibactérienne des molécules pures produites par les souches *S. youssoufiensis* SF10 et *S. coeruleorubidus* SFKH10.

Bactéries testées	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)				
	M3	M4	M5	M6	C1
<i>S. aureus</i> 25	15	30	25	27	28
<i>Bacillus subtilis</i>	18	28	18	25	20
<i>S. scabies</i>	28	25	20	20	23

Les études spectroscopiques se sont poursuivies, d'une part, sur les quatre molécules antibactériennes produites par la souche *S. youssoufiensis* SF10, notées **M3**, **M4**, **M5**, **M6** obtenues en quantités suffisantes. Et d'autre part, sur l'unique antibiotique, notée **C1**, produite par la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 en quantité, également, suffisante (4mg).

2. Résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse et infra-rouge

2.1. Étude de molécules (M3, M4, M5, M6) produites par la souche *S. youssoufiensis* SF10

La comparaison des spectres de RMN ^1H des composés (M3, M4, M5, M6) montrent une grande similitude. Pour faciliter l'élucidation structurale de ces molécules, nous avons choisis de commencer par la molécule M4, puis nous traiterons les autres molécules.

a) Molécule M₄

✓ Propriétés physico-chimiques

Le composé M4 se présente sous forme d'un solide de couleur blanche, soluble dans le méthanol. $[\alpha]_{\text{D}}^{+26}$ (CHCl_3).

✓ Données spectroscopiques

IR (évaporation de MeOH) ν_{max} 3446, 2930, 1715, 1266, 1127 cm^{-1} . Cette molécule semble présenter des groupements OH, COOH et C-O.

Les spectres de masse de la molécule M4 obtenu par ESI-MS, en mode positif et en mode négatif (Figure 44) ont permis d'obtenir, respectivement, un pic d'un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+ = 747,4$ et un pic d'ion $[M-H]^- = 723,4$. La masse moléculaire du produit M4 est, alors, de 724. Cette masse est corrélée par les spectres de masse tandem et MS3 (figure 45).

Les données de l'RMN 1H et RMN ^{13}C et les corrélations HMBC (annexes 3) sont très similaires de celles rapportées par Gong *et al.* (2010).

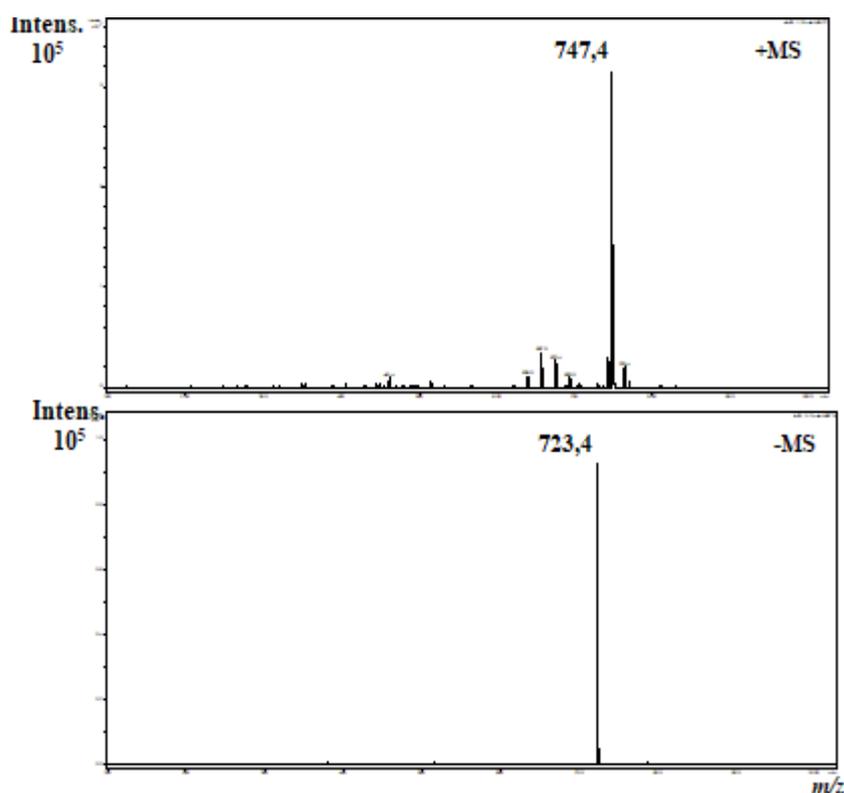


Figure 44 : spectres de masse du composé actif M4 produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10 enregistré en mode positif et négatif.

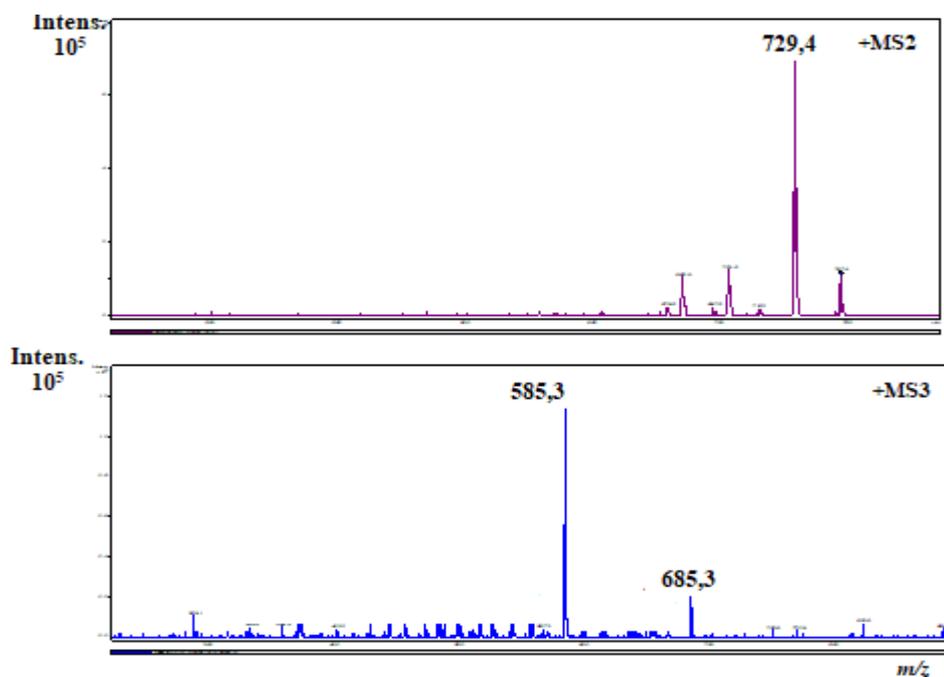


Figure 45: la masse en tandem MS/MS et MS/MS/MS du composé M4 produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10, enregistrés en mode positif.

Tenant compte de tous ces résultats ainsi que des données de la littérature, le composé M4 a été identifié comme étant la **nigéricine** (figure 46). Nos données sont en accords avec ceux rapportés par Gong *et al.* (2010). La formule brute de M4 est $C_{40}H_{68}O_{11}$.

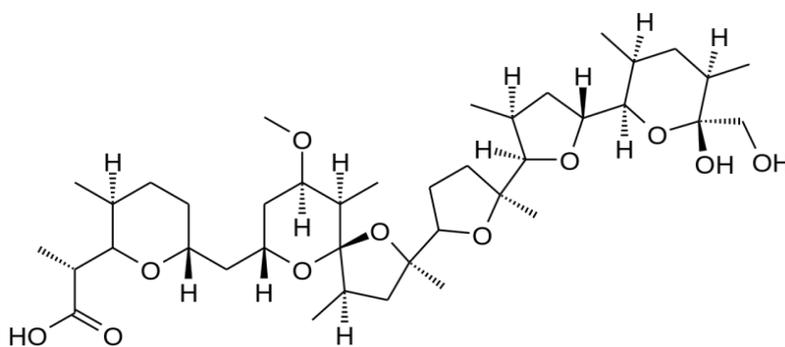


Figure 46 : structure de la molécule M4 produite par la souche *S. youssoufiensis* SF10.

b) Molécule M₃

✓ Propriétés physico-chimiques

Le composé M3 se présente sous forme d'un solide de couleur blanche, soluble dans le méthanol. $[\alpha]_D = 39,3^\circ (C=0,001, \text{MeOH})$.

✓ **Données spectroscopiques**

IR (évaporation de MeOH), ν_{\max} . 3407 ; 2927 ; 1692 ; 1649 ; 1458 ; 1378 ; 1052 et 956 cm^{-1} . Ces valeurs correspondent aux fonctions hydroxyle, acide carboxylique et éther.

UV_{max} 217, 275 nm. Cette valeur confirme ainsi la présence d'un acide carboxylique insaturé dans ce composé.

Les données **RMN ¹H** et **RMN ¹³C** ont été comparées avec ceux rapportés par Siwen *et al.* (2011).

Spectrométrie de masse, +MS (m/z 747,5) ; +MS2 (m/z 729,4) ; +MS3 (685,3) ; ESI(-) MS: m/z 723,5 [M-H]⁻ ; ESI(-) MS/MS (723,5): m/z 679,3, 439,3 (figure 47 et 48).

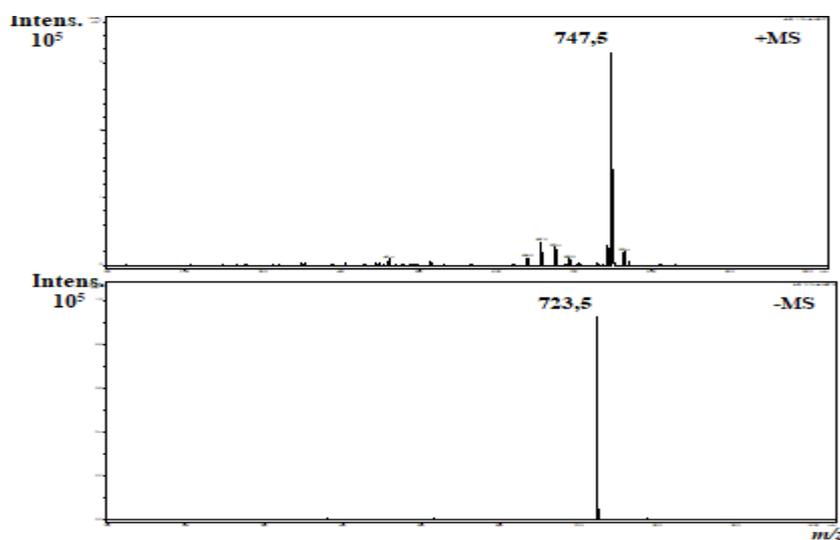


Figure 47: spectre de masse du composé actif M3 produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10.

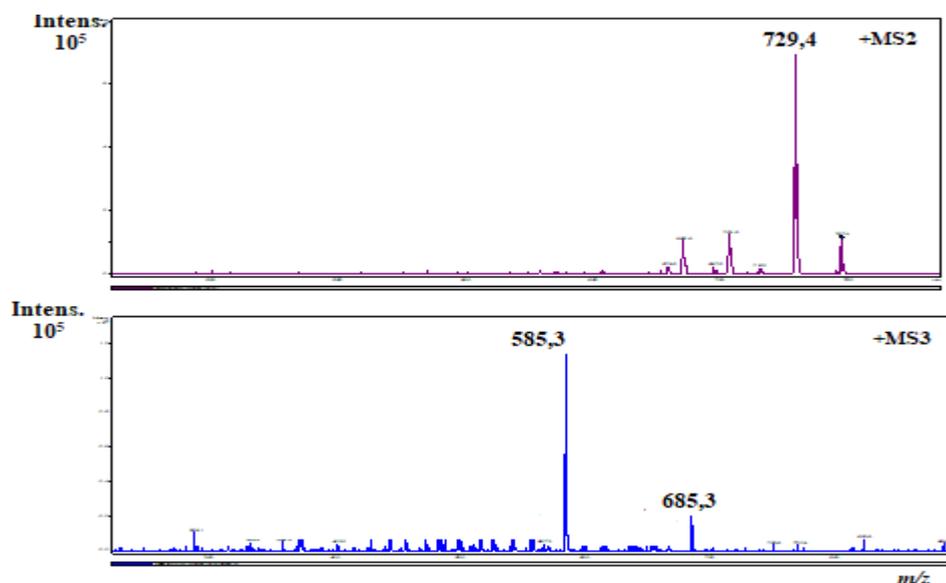


Figure 48 : La masse en tandem MS/MS et MS/MS/MS du composé M3 produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10, enregistrés en mode positif.

En se basant sur les données de la spectrométrie de masse et les analyses spectroscopiques, la structure de la molécule M3 a été déterminée comme étant l'**abiérixine**, appartenant à la famille des polyéthers (figure 49). Nos données sont en accords avec ceux de (Siwen *et al.*, 2011 ; David *et al.*, 1985). La formule brute est $C_{40}H_{68}O_{11}$, de masse de 724,48. (L'ion détecté est $C_{40}H_{68}O_{11} Na$ de masse de 747,46).

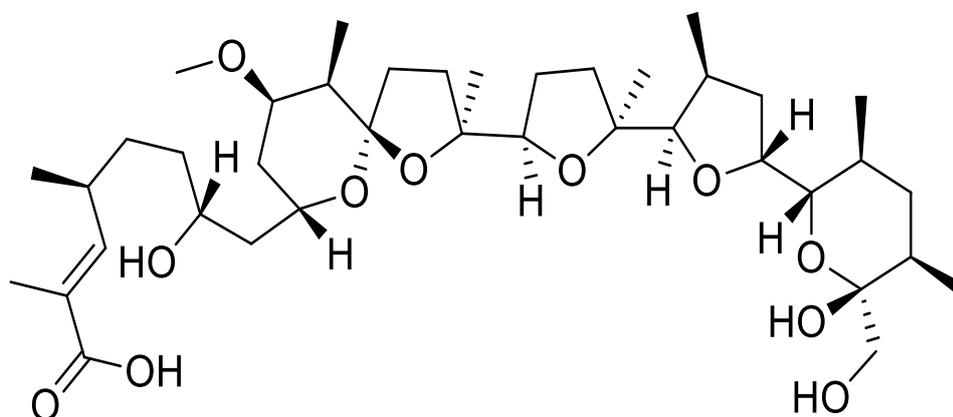


Figure 49 : structure de la molécule M3 produite par la souche *S. youssoufiensis* SF10.

c) Molécule M5

➤ Propriétés physico-chimiques

Le composé M5 se présente sous forme d'un solide de couleur blanche, soluble dans le méthanol.

➤ Données spectroscopiques

IR: 3200, 2900, 1580, 1380, 1120, 1040, 950, 650 cm^{-1} . Ces valeurs indiquent la présence de groupe hydroxyle, groupe carboxyle et groupe éther.

Par la comparaison des spectres RMN ^1H et ^{13}C de la molécule M3 identifiée à la nigéricine et la molécule M5, Nous constatons que les deux molécules ont le même nombre de carbone qui égale à 40 et presque la même structure. Cependant, la RMN 2D, d'une part, était très utile pour confirmer la stéréochimie **du carbone C₂₈** et d'autre part, la RMN COSY a montré un groupe de protons couplés ensemble et séparés par des carbones : Me39-H2-H3-H4-Me38-H5a, H5b-H6a, H6b-H7-H8a-H8b-H9-H10a, H10b-H11-H12-Me37, et Me36-H14-H15a, H15b et également H17-H18a, H18b-H19a-H19b. La position de ces trois groupes de protons est similaire à celle de la nigéricine.

Spectrométrie de masse : +MS (m/z 747,5) ; +MS2 (m/z 729,4) ; +MS3 (685,3). ESIMS (-): m/z 723,5 ; [M-H]⁻; ESI(-) MS/MS (723,5): m/z 679,3 ; 439,3.

En se basant sur les données de la spectrométrie de masse et de l'analyse spectroscopique, et en comparaison avec les données rapportées par Berrada *et al.* (1986). La molécule M5 a été identifiée comme étant l'**épinigéricine** (figure 50), **épipimère de la nigéricine**.

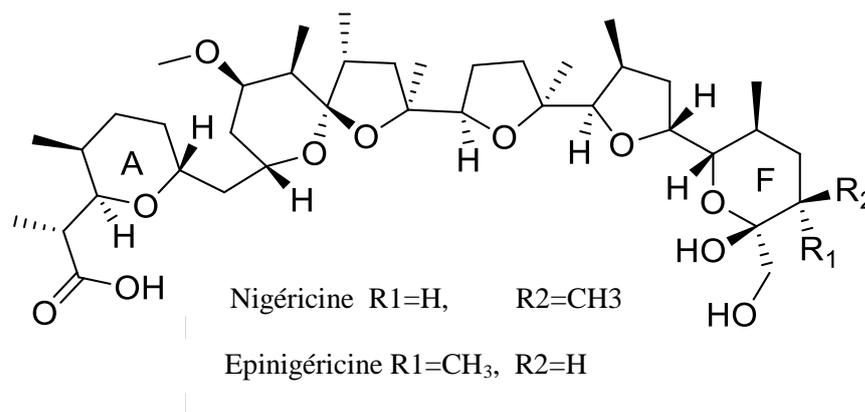


Figure 50 : structure de la molécule M5 produite de la souche *S. youssoufiensis* SF10.

d) Molécule M6✓ **Propriétés physico-chimiques**

Le composé M6 se présente sous forme d'un solide de couleur blanche, soluble dans le méthanol. $[\alpha]_D^{26} +9,1$ (C=0,004 g/ml, MeOH).

✓ **Données spectroscopiques**

IR: 3432 cm^{-1} (très intense), 2928 cm^{-1} (très intense), 1739 cm^{-1} (intense), 1459 cm^{-1} (intense), 1377 cm^{-1} (moyenne), 1220 cm^{-1} (faible), 1113 cm^{-1} (intense), 1061 cm^{-1} (très intense), 961 cm^{-1} (intense).

Une corrélation significative a été détectée à 3,72 ppm (s, COOMe) avec 51,7 ppm dans le spectre HSQC (annexe 3) et un couplage à long terme observé dans le spectre HMBC (annexe 3) établi également avec C=O à 176,4 ppm (COOMe) ainsi le remplacement du groupe carboxyle par le méthyle ester. Ceci est en accord avec sa polarité faible qui est responsable du temps de rétention très long dans la chromatographie en phase inverse.

Spectrométrie de masse : ESI(+)**MS:** m/z 745,48526 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, MS/MS(745): m/z 713,46007 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}+\text{Na}]^+$, HRMS(+)**ESI:** m/z 745,48526 \pm 0.00500 ($\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{NaO}_{10}$, calcul 745,486120); ESI(-)**MS:** m/z 721,48169 $[\text{M}-\text{H}]^-$, HRMS(-)**ESI:** m/z 721,48169 \pm 0,00500 ($\text{C}_{41}\text{H}_{69}\text{O}_{10}$, calcul 721,489622)(figure 51 et 52).

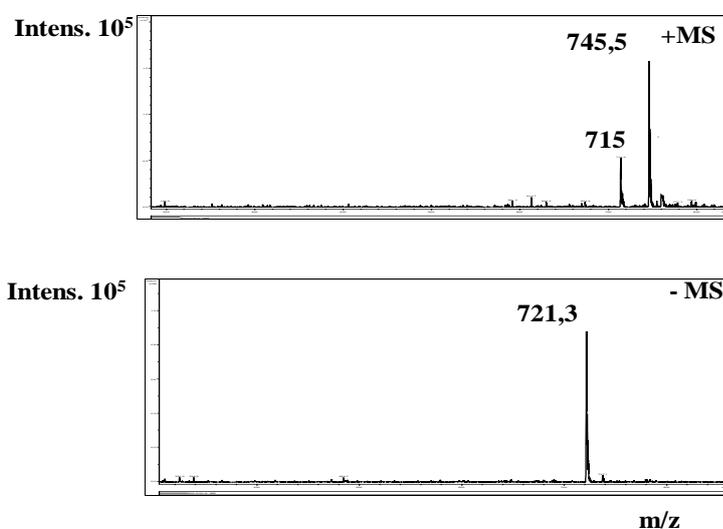


Figure 51 : spectre de masse du composé actif M6 produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10, enregistré en mode positif et négatif.

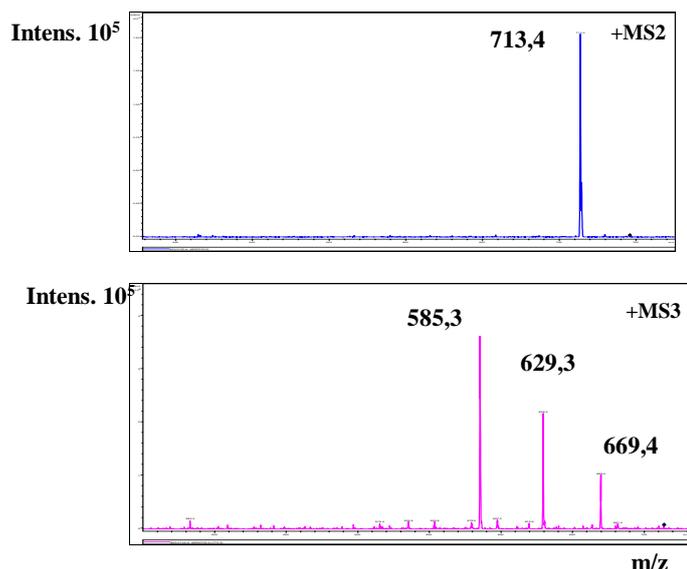


Figure 52: la spectrométrie de masse tandem MS/MS et MS/MS/MS du composé M6 produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10, enregistrés en mode positif.

Ainsi, toutes les données analytiques ont permis d'identifier la molécule M6 de formule brute C₄₁H₆₉O₁₀ et de masse 721,489622 à la **molécule grisorixine méthyle ester un nouveau dérivé de la grisorixine produite naturellement** (figure 53).

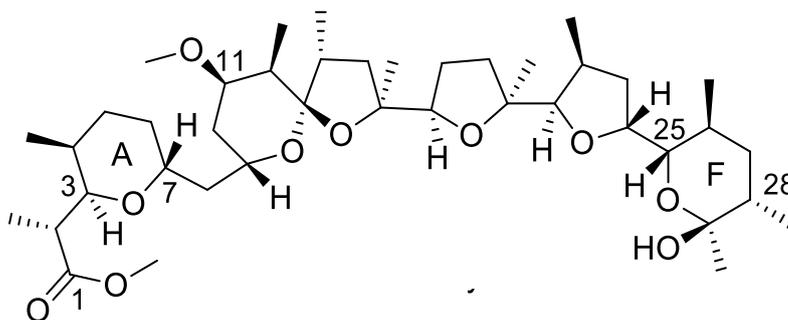


Figure 53: structure de la molécule M6, produite par la souche *S. youssoufiensis* SF10.

2.2. Étude de la molécule produite de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 (molécule C1)

✓ Propriétés physico-chimiques

Cette molécule a un aspect huileux de couleur marron, très soluble dans le méthanol. Cette molécule n'absorbe pas sous l'UV et apparait sous CCM de couleur violette après une carbonisation par anisaldéhyde /acide sulfurique.

✓ Données spectroscopiques

IR : 1730 cm^{-1} , 1712 cm^{-1} (OC=O).

L'analyse par RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été comparées avec les données rapportées par Haneda *et al.*, 1947 et Bell *et al.*, 1994.

Le spectre de masse de la molécule C1 obtenu par ESI-MS, montre un ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 788 enregistré en mode positif. (figure 54). Ainsi, la formule brute du produit serait alors $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{12}$. Toutes les données analytiques et par comparaison aux données rapportées par la littérature (Haneda *et al.*, 1947 ; Bell *et al.*, 1994), la molécule C1 a été identifiée comme étant **la dinactine** (figure 55).

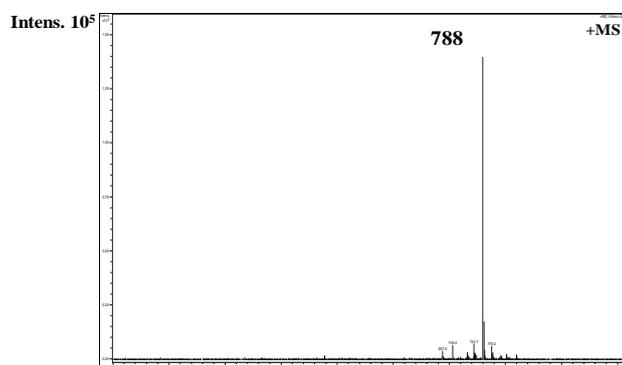


Figure 54 : spectre de masse du composé C1 en mode positif de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10.

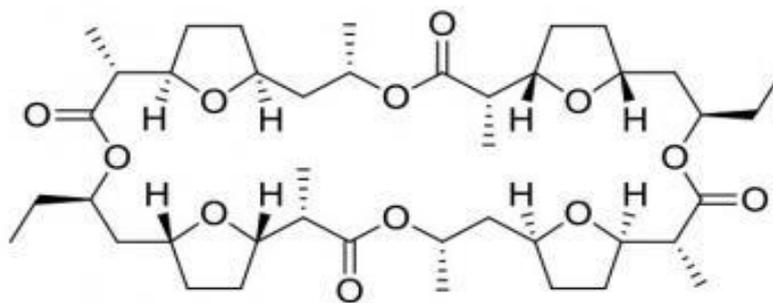


Figure 55 : structure chimique du composé C1 produit par la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10.

3. Analyse computationnelle de l'épimérisation structurale de la nigéricine et de la grisorixine méthyle ester

Afin d'identifier la forme la plus stable de la nigéricine et de la grisorixine, nous avons évalué les valeurs énergétiques associées aux différents isomères. Les calculs de la théorie fonctionnelle sont capables de fournir des structures minimisées en énergie. En effet, la DFT est une théorie destinée à décrire les propriétés de l'état fondamental de la molécule. Dans ce travail, une étude des valeurs énergétiques associées à chaque isomère permet d'identifier la molécule épimérique thermodynamiquement stable. Un exemple efficace d'utilisation de la méthode DFT pour étudier les épimères a été récemment rapporté pour les dérivés de gluco- et de galactoside, différant par leur disposition stéréochimique d'un groupe hydroxyle (Ahmadi *et al.*, 2017). Pour faciliter les calculs, nous avons considéré des molécules simplifiées comme modèle pour le cycle F des structures de la nigéricine et de la grisorixine (figure 56).

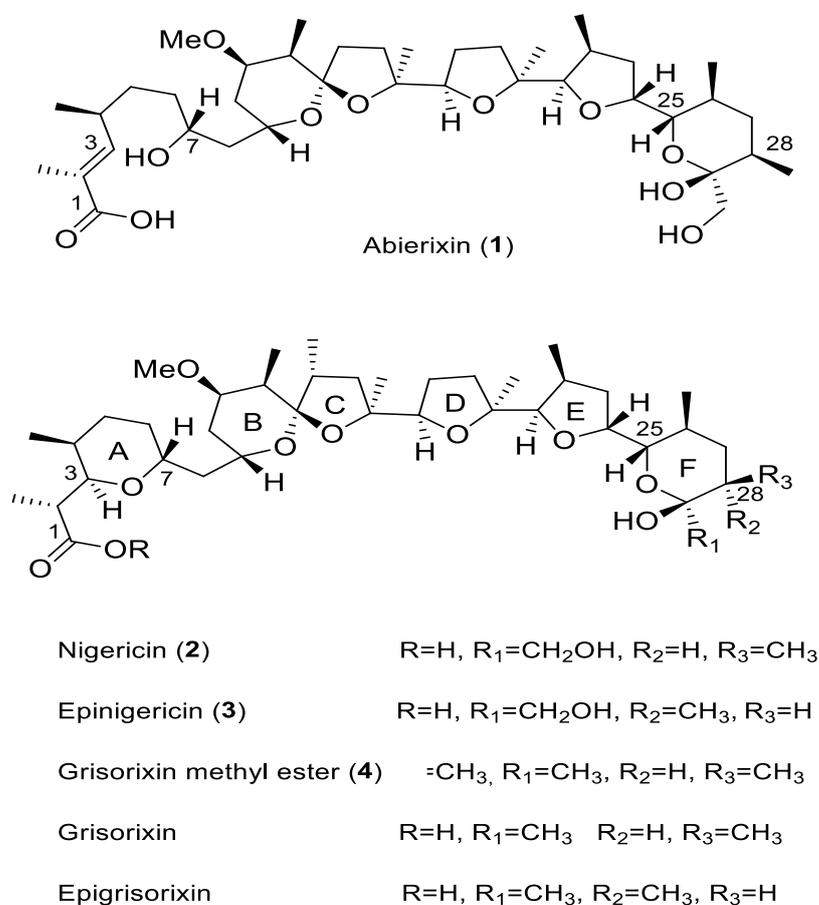


Figure 56: structure chimique des polyéthers, abierixine, nigéricine, épinigéricine et grisorixine méthyle ester, produits par la souche *S. youssoufiensis* SF10.

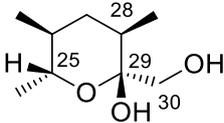
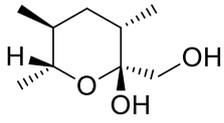
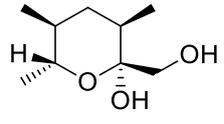
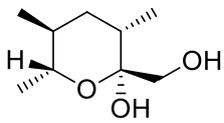
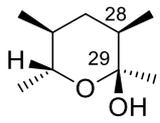
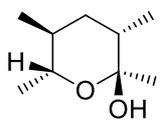
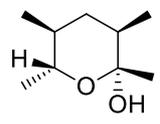
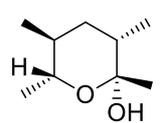
Spécifiquement, le 2(méthylhydroxyle)-3,5,6-triméthyltétrahydro-2H-pyran-2-ol a été sélectionné pour la série analogue à la nigéricine et le 2,3,5,6-tétraméthyltétrahydro-2H-pyran-2-ol pour l'analogue à la grisorixine. Les valeurs d'énergie des modèles obtenus à partir de l'analyse computationnelle à un niveau de théorie B3LYP / 6-31G (d, p) pour la nigéricine ou la grisorixine ont été comparées respectivement à l'épinigéricine ou à l'épigrisorixine et à leurs isomères C₂₉ correspondants.

Les données ont été obtenues sous vide et en présence d'eau. Cette dernière étant considérée plus représentative de l'environnement biologique.

Dans la série analogue à la nigéricine, l'unité épinigéricine s'est révélée légèrement plus stable que la nigéricine (AE = 0,4129 KJ / mol sous vide et AE = 2,5992 KJ / mol dans l'eau). Alors que les structures présentant une configuration inversée au centre (émiacétalique). C₂₉ sont, significativement, moins stables si nous les comparons à la nigéricine (AE = 5,4877 KJ / mol sous vide et AE = 6, 2003 KJ / mol dans l'eau).

Pour la série de la grisorixine, sa configuration au niveau du cycle F est la plus stable par rapport à l'épigrisorixine C-28 ($\Delta E = 9,9357\text{KJ} / \text{mol}$ sous vide et $\Delta E = 6,1825\text{KJ} / \text{mol}$ dans l'eau), et en particulier avec les formes épimères en C₂₉ de la grisorixine et de l'épigrisorixine (tableau 23).

Tableau 23: les valeurs d'énergie calculées par TFD à un niveau théorique B3LYP/6-31G(d,p) du cyle F des structures simples prises comme modèles.

		<i>sous vide</i>		<i>dans l'eau</i>	
Nigéricine-like	Moitié structurale	Energie (u.a.)	ΔE associée à la nigéricine (kJmol ⁻¹)	Energie (u.a.)	ΔE associé à la nigéricine (kJmol ⁻¹)
Nigéricine (2)		-579,49456813	-	-579,50211165	-
Epiginigéricine (3)		-579,49472552	-0,4129	-579,50310163	-2,5992
C-29 épimère de la nigéricine		-579,49332270	+ 3,2719	-579,50051262	+4,1983
C-29 épimère de l' epiginigéricine		-579,49247169	+5,4877	-579,49975007	+6,2003
Grisorixine-like	Moitié Structural	Energie (u.a.)	ΔE associé à la grisorixine (kJmol ⁻¹)	Energie (u.a.)	ΔE associé à la grisorixin (kJmol ⁻¹)
Grisorixine		-504,28877454	-	-504, 29328817	-
Epigrisorixine		-504,28631943	+9,9357	-504,29093337	+6,1825
C-29 épimère de la grisorixine		-504,28317969	+14,6900	-504,28881966	+11,7321
C-29 épimère de l' épigrisorixin		-504,28136691	+19,4472	-504,28673415	+4,1127

Discussion

Les études spectroscopiques se sont poursuivies sur les molécules notées M3, M4, M5 et M6 produites par la souche *S. youssoufiensis* SF10 et la molécule C1 produite par la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10, choisis en raison de leur activité et leurs quantités suffisantes.

Les quatre molécules obtenues à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche *S. youssoufiensis* SF10 et ceci après une séquence de séparations chromatographiques, ont été analysées par RMN 1D & 2D et spectrométrie de masse (ESI-MS et HR-ESI-MS).

La structure du composé M3 a été déterminée comme étant l'abierixine. Ce composé polaire, a été isolé comme un produit mineur et identifié par comparaison avec les données rapportées par David *et al.* (1985). Cette molécule est très peu décrite dans la littérature. Deux autres métabolites ont été détectés également dans l'extrait actif de notre souche. La nigéricine et l'épinigéricine ont été identifiées en comparant nos données analytiques (MS et RMN) à celles rapportées par (Taechowisan *et al.*, 2013; Berrada *et al.*, 1986)

Dans cette étude, un nouveau dérivé, a été isolé pour la première fois comme produit naturel à savoir la grisorixine méthyle ester.

Ces molécules (abierixine, nigéricine, épinigéricine et grisorixine méthyle ester), ont des structures très proches aux composés appartenant à la famille des polyéthers ionophores qui sont réputés actifs contre les Gram (+) et ne présentent aucune activité contre les Gram (-). Il a, aussi, été rapporté que les polyéthers sont très actifs contre les phytopathogènes comme *Eimeria tenella* (Rutkowski et Brzezinski, 2013). Ces composés chimiques sont connus pour être produits par les actinobactéries, en particulier le genre *Streptomyces* (Rutkowski et Brzezinski, 2013). Par ailleurs, il a été signalé la production de Kijimicin, polyéther ionophore, par une culture du genre *Actinomadura* sp. MI215-NF3 (Takahashi *et al.*, 1990), CP-91243 et CP-91244 par *Actinomadura roseorufa* (Dirlam *et al.*, 1991).

La nigéricine est considérée comme composé majeur produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10. En effet, cette molécule est synthétisée, également, par différentes espèces du genre *Streptomyces* (Harvey *et al.*, 2007; Taechowisan *et al.*, 2013). Son biosynthèse est récemment étudié par (Harvey *et al.*, 2007). Cette molécule est connue pour ses propriétés antibactériennes, antifongiques, antimalariques (Gumila *et al.*, 1997) et elle est capable, également, d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (Hegazy *et al.*, 2016 ;

Yakisich *et al.*, 2017). La nigéricine a montré une activité importante contre *S. aureus*. Cette forte activité pourrait être due à la présence de groupement OH (Gong *et al.*, 2010). Grably *et al.* (1992) ont montré, également, que le groupe OH porté par le C₂₉ d'un dérivé de la nigéricine est essentiel pour l'activité antimicrobienne et antivirale.

La souche *S. youssoufiensis* SF10 est capable de produire même l'épimère, de la nigéricine. Cette forme épimère présente une configuration inversée au niveau du carbone C₂₈ (Berrada *et al.*, 1987).

Nous avons pu établir que ces deux métabolites sont présents dans l'extrait brut de la souche *S. youssoufiensis* SF10 à un ratio de 75:25 comme il a été démontré dans le chromatogramme de LC/MS. L'épinigéricine a un spectre large touchant plusieurs bactéries pathogènes à Gram positif et également quelques parasites. Une étude de la toxicité de l'épinigéricine, vis-à-vis du cilié *Tetrahymena pyriformis*, a montré que cette molécule a pu arrêter la division cellulaire (Bamdad *et al.*, 1995).

La structure du nouveau dérivé, grisorixine méthyle ester, a été définie par comparaison avec les données de l'RMN rapportées pour la grisorixine (Gachon *et al.*, 1970; Cuer *et al.*, 1983; Oikawa *et al.*, 1992) et l'épigrisorixine (Mousslim *et al.*, 1993). Les spectres RMN ¹³C permettent de distinguer entre la grisorixine et l'épigrisorixine, qui présentent des changements de déplacement chimique pour les carbones appartenant au niveau du cycle F, en particulier pour les signaux C₂₆-C₂₈ (signal C₂₆ passe de 32,9 à 25,3 ppm) (Mousslim *et al.*, 1993). Des signaux RMN ¹³C, de notre analyse, attribuables au cycle F ont été détectés et qui sont en accord avec les données rapportées pour la grisorixine dissous en CDCl₃ (Oikawa *et al.*, 1992). Le remplacement de l'unité carboxylique par un ester méthylique a été confirmé par l'expérience HMBC, où le singlet à 3,72 ppm, attribué au groupe COOMe, est en corrélation avec le seul signal détecté dans la région C=O à 176,4 ppm. La bande IR intense à 172,5 cm⁻¹ attribuée au C=O carboxylique présent dans la structure de grisorixine (Cuer *et al.*, 1983) a été remplacée par une bande forte à 1739 cm⁻¹ attribuée au groupe ester.

La Grisorixine méthyle ester **n'a pas été isolé précédemment comme métabolite**. Cependant, elle a été signalée comme un dérivé de la grisorixine dans une réaction d'oxydation du produit naturel (Gachon et Kergomard, 1975). Le profil LC-ESI-MS de l'extrait brut de la souche *S. youssoufiensis* SF10 a dissipé le doute selon lequel la présence d'un ester méthylique dans la structure du métabolite M6 pourrait être un artefact dû aux

procédures d'isolement. En effet, le composé M6 a été détecté, dans ce travail, comme un dérivé méthylé alors que la nigéricine et l'épinigéricine sont des acides libres, dans les mêmes conditions chromatographiques. Un autre composé, nigéricine méthyl ester, montrant une unité COOMe similaire au composé M6 a été décrit également comme un métabolite isolé par élution d'une colonne de gel de silice en utilisant de l'hexane/acétate d'éthyle (Taechowisan *et al.*, 2013).

Selon la littérature, le suivie du processus de la biosynthèse des polyéthers ionophores comme ceux isolées dans notre étude, a montré que l'hydroxylation de la grisorixine à la nigéricine (M4) représente une étape finale dans la biosynthèse de ce métabolite (Mouslim *et al.*, 1995). L'épimérisation de la nigéricine et de la grisorixine pour donner respectivement de l'épinigéricine et de l'épigrisorixine, a été produit par une voie enzymatique au cours du processus de la détoxification surtout chez *S. hygrosopicus* (Mouslim *et al.*, 1993).

La production de de la nigéricine/épinigéricine par la souche *S. youssoufiensis* SF10 et la grisorixine/épigrisorixine (Gachon *et al.*, 1970 ; Mouslim *et al.*, 1993), portant une configuration épimérique au niveau du cycle F, nous a amené à approfondir cet aspect. Le calcul de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT : *Density Functional Theory*) est en mesure de fournir des structures d'énergie minimale. En effet, DFT est largement utilisée comme approche pour l'étude des propriétés électriques des matériaux. Plus précisément, une étude sur les valeurs énergétiques associées à chaque isomère permet d'identifier la molécule épimère thermodynamiquement stable

Afin de faciliter le processus de calcul, nous avons considéré une structure simplifiée prise comme modèle pour le cycle F des polyéthers isolés. Les structures modèles avec la même stéréochimie au niveau du carbone C₂₈ et C₂₉, présent dans la nigéricine et la grisorixine, ont été prises comme références pour la série de la nigéricine-like et grisorixine-like, respectivement.

Pour la série de la nigéricine-like, le métabolite épimérique au niveau du C₂₈, épinigéricine, s'est avérée être légèrement plus stable que la nigéricine ($\Delta E = 0,4129$ KJ/mol sous vide et $\Delta E = 2,5992$ KJ/mol dans l'eau). Au contraire, la structure montrant une configuration inversée au centre émiacétalique C₂₈ a été moins stable par rapport à la nigéricine.

Pour la série de la grisorixine-like, la configuration de la grisorixine au niveau du cycle F a donné la plus stable molécule, tandis que l'épigrisorixine au niveau du C₂₉, ainsi que les formes épimériques C₂₉ de la grisorixine et de l'épigrisorixine sont moins stables.

Ces résultats pourraient fournir une explication thermodynamique au processus d'épimérisation des métabolites. Epinigéricine et épigrisorixine qui sont les épimères au niveau du carbone C₂₈ de la nigéricine et de la grisorixine respectivement, sont tous les deux rapportés, dans la littérature, comme métabolites souvent extraits. Tandis que les isomères correspondants provenant de l'épimérisation émiactétalique à C₂₉ ont été rarement extraits jusqu'à présent à notre connaissance. Ces considérations sont d'un intérêt général car elles peuvent être appliquées à une large gamme de polyéthers naturels polycycliques. Etant donné que la moitié structurale du cycle F considérée pour la nigéricine est présente dans certains polyéthers comme l'endusamycine, CP-120509, la monensine, la laidlomycine, l'octacyclomycine et la moyukamycine X-14931A. Pareillement, la moitié structurale du cycle F considérée pour la grisorixine est présente, également, dans les polyéthers smutalomycine, la senduramycine, l'emduramicine, CP-91243, CP-91244 et W341C (Rutkowski et Brzezinski, 2013).

Pour la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10, les investigations de recherche se sont poursuivies sur l'unique composé obtenu en quantités suffisantes et noté C1. La structure de ce composé a été déterminée comme étant la dinactine. Ce dernier appartient à une famille d'antibiotiques ionophores, les macrotétrolides, qui constituent avec les polyéthers la grande famille de polykétides. Les macrotétrolides constituent un vaste groupe de molécules naturelles. Ces antibiotiques polaires possèdent une propriété ionophorétique ayant comme origine un acide nonactique et un acide homononactique (Crevelin *et al.*, 2014). L'activité antibactérienne est due à leur propriété ionophore.

S. coeruleorubidus, largement, décrite par la littérature comme une productrice de l'antibiotique pacidamycine (Karwowski *et al.*, 1989) et feudomycine (Toshikazu *et al.*, 1981). Cependant, la dinactine n'a jamais été signalé chez cette espèce. Jiao *et al.* (2015) ont étudié l'influence de la composition de milieu de culture sur la production de la dinactine par une souche de *Streptomyces*. L'addition soit du succinate, du malonate ou bien du citrate dans le milieu de fermentation a augmenté la production de cet antibiotique.

Chapitre 4 : Étude de la cytotoxicité des deux composés purs : la nigéricine (M4) et la grisorixine méthyle ester (M6) produits majeurs de la souche *S. youssoufiensis* SF10.

La contribution des produits naturels aux industries pharmaceutiques n'est plus à démontrer et beaucoup de produits sont utilisés à des fins thérapeutiques comme les antibiotiques. Récemment, les produits naturels dotés d'une bioactivité élevée ont été introduits dans la chimiothérapie anticancéreuse.

En effet, des progrès considérables ont été effectués durant les trente dernières années pour permettre de guérir les personnes atteintes d'un cancer. Néanmoins, certains types de tumeur, comme le glioblastome multiforme (GBM) garde un pronostic particulièrement sombre (Stupp *et al.*, 2005). Il s'agit d'une tumeur cérébrale la plus fréquente et de degré de malignité le plus élevé.

Le cerveau est constitué de deux types cellulaires principaux : les neurones et les cellules gliales qui leur servent de soutien. Le plus souvent, les tumeurs cérébrales se développent à partir des cellules gliales : les gliomes. Parmi ces derniers, les astrocytomes se forment à partir des cellules astrocytaires et constituent un type de tumeur spécialement agressif et résistant à toute forme de thérapeutique. Ces tumeurs touchent, particulièrement, les sujets adultes.

De nouvelles stratégies thérapeutiques doivent donc être développées dans le but de traiter ce type du cancer. Dans cette optique, nous avons étudié l'effet de la nouvelle molécule **grisorixine méthyle ester en comparaison avec de la nigéricine** sur la prolifération de deux lignée de cellules souches de glioblastomes. Cette partie du travail a été réalisée au niveau du *Centre for Integrative Biology*, (CIBIO) Université Trento, Italie.

Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Neurosphères en suspension

Deux types de lignées de cellules souches de gliome (CSGs) (*Comi Brighnty et Vipi*), provenant de patients humains, nous ont été fournies par le laboratoire Antonio Daga (*Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova (Genova, Italie)*).

Les cellules sont dissociées mécaniquement et mises en culture sur le milieu Dulbecco's *Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture* F-12 (DMEM-F12) (TermoFisher) ; neurobasal (1:1, pH 7,4), enrichi avec du B27 (100X) , en présence de 2mmol/l Glutamax1 ; 100 U/ml pénicilline G (Sigma) ; 20ng/ml EGF (R&D 236-EG) ; 10ng/ml FGF2 (R&D 236-EG) et 2µg/ml héparine (Sigma). Ce milieu est nécessaire pour le maintien des propriétés des cellules-souches. Après 6 jours de culture en incubateur (37 °C et 5% CO₂), seule une infime partie des cellules va proliférer pour former des clones de cellules indifférenciées flottant dans le milieu : les neurosphères.

1.2. Entretien des cultures secondaires de neurosphères

Les neurosphères, maintenues dans des flacons, sont récoltées par centrifugation (200g ,10 mn), puis complètement dissociées dans du milieu de dissociation (Accutase solution, Sigma Aldrich, A6964) puis mécaniquement effilée à l'aide d'une pipette Pasteur.

Les cellules dissociées sont cultivées dans 20 ml de milieu de culture. Nous obtenons, alors, des neurosphères secondaires. Cette opération est renouvelée tous les cinq à sept jours, ce qui permet d'amplifier la population de neurosphères à chaque passage.

1.3. Cellules adhérentes

Les neurosphères sont déposées dans des boîtes de Pétri couvertes de la laminine (Sigma, L2020, 1mg/ml) et incubées trois à quatre heures à 4 °C, pour assurer une adhésion adéquate des cellules au support.

2. Test de cytotoxicité *in vitro*

Le test de cytotoxicité permet la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire par une méthode évaluant le paramètre de viabilité cellulaire. Son but est de déterminer la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀) qui est la concentration qui inhibe de moitié la prolifération cellulaire globale. L'évaluation quantitative des cellules viables a été réalisée par la méthode d'exclusion au bleu de trypan.

Les lignées cellulaires du cancer humain de glioblastome sont mises en culture dans des plaques 96 puits à raison de 4000 et 3500 cellules par puits, respectivement, pour *COMI* et pour *VIPI* et incubées durant 24 heures à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

La première rangée de la plaque multipuits a été utilisée comme contrôle et de ce fait ne contenait que le milieu de culture. Lorsque la surface de recouvrement des autres rangées de la plaque atteint une confluence de 80 %, les cellules sont, ainsi, traitées par des concentrations croissantes de la nigéricine (M4) et de la grisorixine méthyle ester (M6) après leur dissolution en diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les plaques sont remises en incubation pendant 48 heures à 37 °C avec 5% de CO₂.

Après la période d'incubation, une solution de Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) et d'iodure de propidium (PI, Sigma Aldrich) est ajoutée dans les 96 puits à une concentration de 1µg/ml. Les 96 puits sont, par la suite, incubés pendant 20min à une température ambiante à l'abri de la lumière.

La lecture des résultats s'effectue à l'aide d'un système de type *Operetta High Content Imaging System* (Perkin Elmer). Le nombre de cellules vivantes pour chaque traitement a été estimé en soustrayant les cellules positives au PI du nombre total de cellules comptées en utilisant Hoechst. Le pourcentage des cellules vivantes a été calculé par rapport au contrôle (100% de viabilité) et comparé à celui des cellules traitées par la témozolomide (Sigma, Aldrich), molécule indiquée pour le traitement des patients atteints de glioblastome multiforme, prise comme référence.

Des courbes dose-réponse c'est-à-dire viabilité en fonction des concentrations des molécules bioactives sont réalisées pour chacune des molécules sur chaque type de la lignée cellulaire. Ces courbes nous ont permis de calculer les CI₅₀ des molécules nigéricine, de la grisorixine méthyle ester et de la témozolomide prise comme référence. Ces analyses de viabilité ont été réalisées quatre fois, et ce pour chaque molécule.

3. Analyse statistiques

Les analyses statistiques et les représentations graphiques des données sont réalisées à l'aide du logiciel *Graph Pad Prism*.

Résultats

1. Test de cytotoxicité

Les deux polyéthers ionophores (nigéricine et grisorixine méthyle ester) ont montré une toxicité beaucoup plus élevée par rapport à la référence, le médicament actuellement

utilisé dans le traitement de GBM (tableau 24). De plus, la grisorixine méthyle ester s'est révélée trois fois plus puissante que la nigéricine.

Le traitement par la nigéricine et la grisorixine méthyle ester a entraîné une inhibition dose-dépendante de la croissance des deux types de cellules cancéreuses testées (figure 57). Les valeurs de CI_{50} de la nigéricine sont $14,4 \mu\text{M}$ ($SD \pm 3,24$) et $12,6 \mu\text{M}$ ($SD \pm 2,30$) pour *COMI* et *VIPI* respectivement (tableau 24). Alors que celles de la grisorixine méthyle ester sont de $3,1 \mu\text{M}$ ($SD \pm 0,92$) et $3,85 \mu\text{M}$ ($SD \pm 0,78$). Ces résultats indiquent clairement, que la grisorixine méthyle ester inhibe trois fois plus que la nigéricine, la prolifération des deux types de cellules souches du glioblastome, alors qu'elle est, environ, 90 fois plus efficace que le témozolomide utilisée dans le test comme contrôle positif.

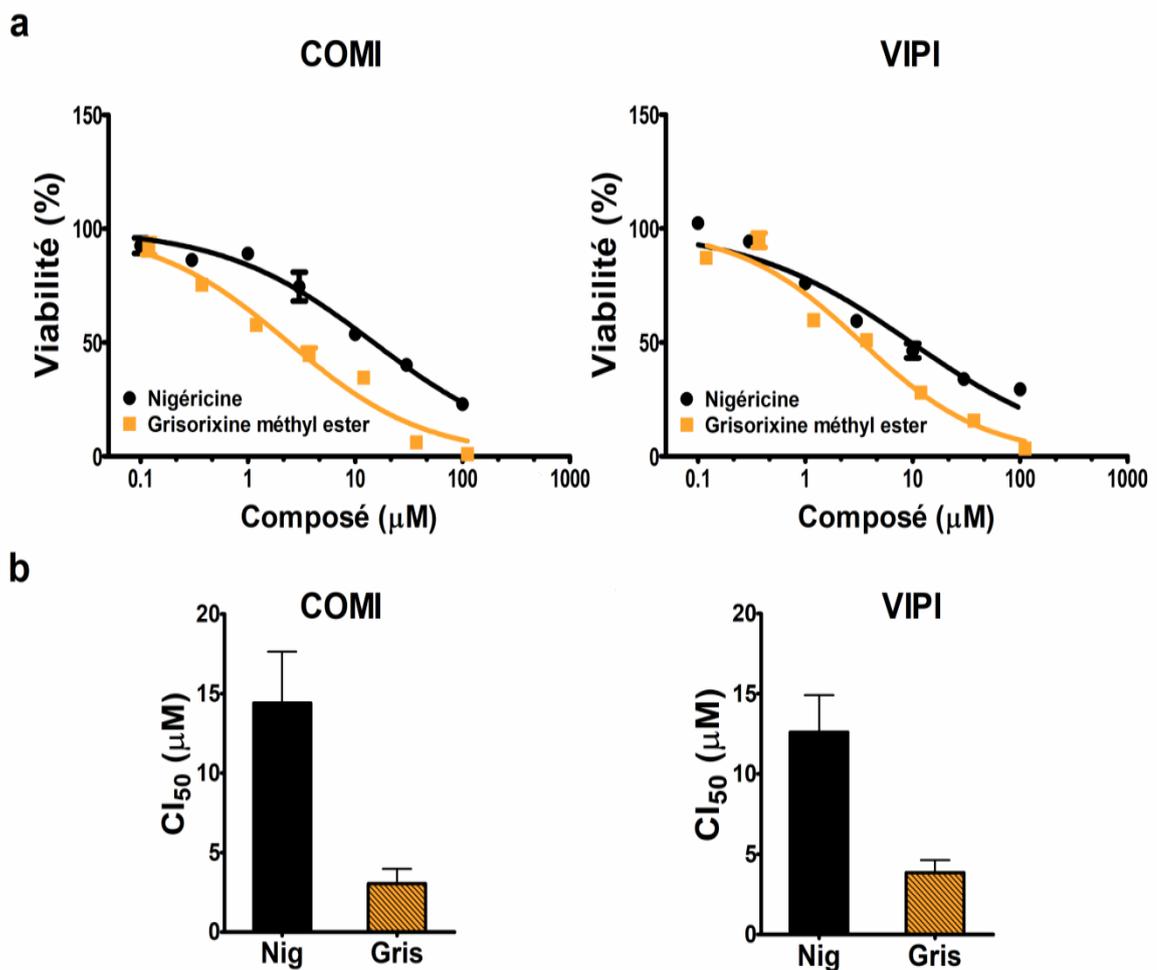


Figure 57: **a.** Des courbes dose-réponse des cellules de glioblastomes (*COMI* et *VIPI*) traitées par la nigéricine et grisorixine méthyle ester. **b.** Valeurs de CI_{50} de la nigéricine et de la grisorixine méthyles ester.

Tableau 24: inhibition *in vitro* des cellules de glioblastomes VIPI et COMI par la nigéricine et la grisorixine méthyle ester.

Cytotoxicité CI ₅₀ (µM)		
Composés	COMI	VIPI
Nigéricine	14,40 ± 3,24	12,60 ± 2,30
Grisorixine méthyle ester	3,05 ± 0,92	3,85 ± 0,78

Discussion

Au cours des dernières décennies, les produits naturels ont joué un rôle, bien établi, en tant qu'agents chimiothérapeutiques anticancéreux, soit dans leur forme non modifiée (naturel) ou synthétiquement modifiés. Les actinobactéries représentent une source prolifique de divers métabolites bioactifs et nous ont fournis une partie des produits naturels les plus importants pour l'industrie pharmaceutique.

Hegazy *et al.* (2016) ont montré l'efficacité de la nigéricine, polyéther ionophore, de perturber l'équilibre énergétique des cellules de gliome et de supprimer les phénotypes malins de cellules GBM dérivées de patients humains à la fois *in vitro* et *in vivo*. Sur la base de ce potentiel thérapeutique de la nigéricine, il a été intéressant d'évaluer l'activité cytotoxique de la nouvelle molécule grisorixine méthyle ester par rapport à celle de la nigéricine.

Les deux molécules (la nigéricine et la grisorixine méthyle ester) ont entraîné une inhibition dose-dépendante de la croissance des cellules de glioblastomes. Au vu, des valeurs, les deux composés présentent une toxicité très élevée. Ces résultats, notamment pour la nigéricine, sont comparables à ceux obtenus, récemment, par Deng *et al.* (2013) et Hegazy *et al.* (2016). Par ailleurs, Yakisich *et al.* (2017) ont mis en évidence l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses résistantes.

De nombreux polyéthers ionophores sont dotés d'un important potentiel thérapeutique du cancer. À titre d'exemple nous citons la salinomycine dont l'effet antinéoplasique (blocage de la prolifération du néoplasme) a été démontré par Manago *et al.* (2015).

La grisorixine méthyle ester s'est montrée plus toxique que la nigéricine. Cette forte activité sur les cellules cancéreuses peut être attribuée à sa lipophilie élevée, ce qui facilite son passage à travers la membrane cellulaire.

Le cerveau est un organe extrêmement dynamique qui nécessite une grande protection. Celle-ci est assurée, naturellement, par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, le problème majeur du GBM est sa résistance aux traitements à cause des propriétés étanches de la BHE qui rend difficile l'apport des molécules thérapeutiques à la cible. Par conséquent, un traitement efficace du GBM nécessite le ciblage du compartiment des cellules souches cancéreuses par des molécules capables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Ceci, se traduit par le calcul du paramètre de la superficie de la surface polaire (PSA : *Polar surface area*) qui est l'un des paramètres les plus importants utilisés pour caractériser les propriétés du transport des médicaments exprimé en Angstrom (\AA^2 , unité de mesure les distances atomiques). La superficie de la surface polaire est définie comme la somme des surfaces des atomes polaires (habituellement, l'oxygène, l'azote, le soufre, le chlore et l'hydrogène) dans une molécule. En donnant ainsi une très bonne corrélation avec la pénétration à travers la BHE (Dréan *et al.*, 2016). La prédiction de données *in silico* réalisée par le logiciel *MarvinSketch* a fourni les valeurs de 145, 20 \AA^2 pour la nigéricine, 131,37 \AA^2 pour son méthyle ester et 111,14 \AA^2 pour la grisorixine méthyle ester. La valeur obtenue pour la grisorixine méthyle ester est plus proche de la valeur de 105,94 \AA^2 obtenue pour le témozolomide, qui est connu par sa capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique.

À l'instar des travaux de Huczynski, (2012), ces résultats préliminaires présentés ici, confirment également, l'utilisation potentielle des polyéthers comme médicaments anticancéreux suggérant que même de petites modifications structurelles pourraient améliorer leur puissance et leur capacité de pénétrer la BHE. L'activité antiproliférative de la grisorixine méthyle ester sur les cellules souches du glioblastome représente un point de départ prometteur pour une étude plus poussée de la relation structure-activité (SAR : *structure activity relationship*), visant au développement de nouveaux médicaments pour le traitement du cancer de glioblastome multiforme.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les actinobactéries avec leur diversité et leur arsenal métabolique occupent une place prépondérante en biotechnologie. Elles sont responsables de la production d'environ la moitié des métabolites secondaires bioactifs, notamment les antibiotiques, les agents antitumoraux, les agents immunosuppresseurs et les enzymes. Pour cette raison, les travaux de recherche de l'équipe du Laboratoire de Génie microbiologique et Applications (université des Frères Mentouri Constantine 1) sont axés sur l'exploration de différents biotopes en vue de l'isolement, d'espèces d'actinobactéries productrices, éventuellement, de nouvelles molécules bioactives principalement les antibiotiques. Dans le présent travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'investigation de sols de zones semi-arides algériens afin d'isoler des espèces d'actinobactéries, de mettre en évidence leurs activités antimicrobiennes et de caractériser structurellement leurs molécules bioactives.

Cette étude est entamée par les méthodes classiques d'isolement et de criblage de souches, d'actinobactéries productrices de molécules bioactives, à partir d'un sol rhizosphérique et non rhizosphérique de la région de khenckhela et un sol de Sebkhla de la région d'Oum El Bouahgi. L'isolement a donné une collection de 99 isolats dont la majorité a été obtenue à partir de l'échantillon du sol rhizosphérique de pins d'Alep (conservation des forêts, Khenckhela).

Le criblage a abouti à la sélection de trois isolats représentatifs SF10, SFKH4 et SFKH10, donnant les meilleures inhibitions de croissance des souches-tests. Cette inhibition a été vérifiée contre des bactéries d'importance clinique (*S. aureus* ATCC 25923; *S. aureus* résistante à la méthicilline MRSA ATCC 43300; *B. subtilis* ATCC 6633; *E. coli* ATCC 25922; *K. pneumoniae* ATCC 70603) et des souches fongiques phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*). En effet, de nombreux isolats se sont avérés actifs, ce qui a rendu la sélection beaucoup plus difficile. L'isolat SF10 a inhibé la croissance des bactéries à Gram positif, et a présenté, également, la meilleure inhibition vis-à-vis les souches fongiques testées. L'isolat SFKH10 a inhibé, seulement, la croissance des bactéries à Gram positif. En revanche, l'isolat SFKH4 est le seul qui exerce un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries Gram négatif à savoir *E. coli* et *K. pneumoniae*. Par ailleurs, le pourcentage le plus élevé d'isolats actifs est celui des isolats provenant de la rhizosphère de pins d'Alep.

Les trois isolats performants sélectionnés ont fait l'objet d'une étude taxonomique polyphasique (morphologie, physiologie, chimiotaxonomie et séquençage de l'ADN ribosomique 16S) ce qui a permis d'affilier les isolats SF10, SFKH4 et SFKH10,

respectivement, aux espèces *Streptomyces youssoufiensis* (99,8%), *Streptomyces spororaveus* (99%) et *Streptomyces coeruleorubidus* (99%)

Les antibiotiques produits par les souches *S. youssoufiensis* SF10, *S. spororaveus* SFKH4 et *S. coeruleorubidus* SFKH10 ont été bien extraits par l'acétate d'éthyle, ce qui s'est traduit par d'importantes zones d'inhibition. Les analyses par RMN proton, UV-Visible et LC/MS de certaines fractions actives, provenant des extraits d'acétate d'éthyle, révèlent leurs richesses en molécules antibactérienne et/ou antifongiques notamment pour la souche *S. youssoufiensis* SF10 et *S. coeruleorubidus* SFKH10. Ces deux espèces produisent une large gamme de biomolécules complexes comprenant, probablement, de nouvelles molécules.

L'analyse par différentes techniques chromatographiques (CP, FC et HPLC) des molécules produites, sur une culture solide de la souche *S. youssoufiensis* SF10, a révélé la présence de sept molécules bien distinctes. L'utilisation de la RMN et de la spectrométrie de masse a permis de caractériser chimiquement quatre molécules (M3, M4, M5 et M6). Ces molécules ont, toutes, montré une activité antibactérienne. L'identification a révélé que les quatre molécules appartiennent, respectivement, à l'aberixine, à la nigéricine, à l'épinigéricine et à **la nouvelle molécule grisorixine méthyle ester**. Ces composés font partie de la famille des polyéthers sécrétés, particulièrement, par des espèces du genre *Streptomyces*. **À notre connaissance, la caractérisation chimique de ces quatre biomolécules est la première effectuée depuis l'isolement et l'identification de la souche *S. youssoufiensis* par Hamdi et al., en 2011.**

Pour la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 nous avons réussi à extraire qu'une seule molécule ; la dinactine. Ce composé a montré une activité très puissante contre les bactéries pathogènes testées. La dinactine est connue pour être sécrétée par des espèces du genre *Streptomyces*, notamment *S. griseus*.

Une étude partielle des fractions actives, produites par la souche *S. spororaveus* SFKH4 réalisée par LC/MS et RMN, a révélé la présence des molécules de haut poids moléculaire et qui peuvent être de la même famille.

Nous avons poursuivi notre étude sur les molécules produites par la souche *S. youssoufiensis* SF10. La présence de la forme épimère de la nigéricine, nous a incités à faire une analyse computationnelle par la DFT. Ce type de calcul permet de comparer la stabilité

relative de différentes formes épimériques. Cette étude nous a montré que le métabolite épimérique au niveau C₂₈, épiginigricine, s'est avérée être légèrement plus stable par rapport à la nigéricine. Par contre, pour la série de grisorixine-like, la configuration de la grisorixine au niveau du cycle F, a donné la plus stable molécule par rapport aux épimères étudiés. Ces considérations sont d'un intérêt général car elles peuvent, même, être appliquées à une large gamme de polyéthers naturels polycycliques. Etant donné que la moitié structurale du cycle F considérée pour la nigéricine est présente dans certains polyéthers et pareillement pour la grisorixine.

L'activité antitumorale de deux composés isolés de la souche *S. youssoufiensis* SF10 a été mise en évidence. Ce test a été réalisé contre deux cellules de glioblastome (COMI et VIP1) en comparant avec le témozolomide, molécule prise comme contrôle. Le traitement par la nigéricine et la grisorixine méthyle ester, a entraîné une inhibition dose-dépendante de la croissance des cellules tumorales testées. La grisorixine méthyle ester a inhibé, au moins, trois fois la prolifération des cellules souches du glioblastome par rapport à la nigéricine, en plus d'être au moins 90 fois plus efficace comparée à la molécule contrôle (témozolomide).

En conclusion, l'écosystème semi-aride représente un réservoir de souches d'actinobactéries très actives avec un potentiel de production important de biomolécules. Nous voulons comme preuve, l'isolement de la souche *S. youssoufiensis* SF10 dont les **métabolites antibactériens ont été identifiés pour la première fois par la méthode de bioguidée**. Cette souche présente des capacités prometteuses pour les applications biotechnologiques, notamment dans le domaine médical (antibiothérapie et chimiothérapie). Au terme de ce travail de thèse, plusieurs perspectives pourraient être envisagées et qui peuvent être résumées comme suit :

- la forte activité anticancéreuse développée par la nouvelle molécule grisorixine méthyle ester représente un point de départ pour le développement de nouveau médicament pour le traitement du cancer. En effet, une étude plus poussée de la relation structure-activité (SAR : *structure activity relationship*), visant au développement de nouveaux candidats pour le traitement du glioblastome multiforme, est à explorer ;

-l'optimisation de la production des antibiotiques produits par la souche *S. youssoufiensis* SF10 (effets des sources carbonées et azotées, éléments minéraux, pH, etc.) ;

- la détermination, de la structure chimique des biomolécules présentes dans les autres fractions actives de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10 ;
- la poursuite des études sur la souche *S. spororaveus* SFKH4 en purifiant ses antibiotiques et, en déterminant leurs structures chimiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, A.S., Jordan, M.S., Adams, S.M., Suen, G., Goodwin, L.A., Davenport, K.W., Currie, C.R. & Raffa, K.F. (2011) Cellulose degrading bacteria associated with the invasive woodwasp *Sirex noctilio*. *I.S.M.E J.*, **5**: 1323–1331.
- Adegboye, M. F. et Babalola, O. O. (2012) Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr. J. Agric. Res.*, **7**(15): 2255-2261.
- Ahmadi, S., ManickamAchari, V., Hussain, Z., Hashim, R. (2017) Epimeric and anomeric relationship of octyl- α -D-gluco/galactosides:insight from density functional theory and atom in molecules studies. *Comput. Theor. Chem.*, **1108**: 93-102.
- Aigle, B., Lautru, S., Spitteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Leblond, P., Pernodet, J.L. (2014) Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **41**: 251–263.
- Alexander, S. S., Bohdan, E. O., Victor, A. F., Galina, M. S., Elena, M. T., Sofya, N. S., Lidiya, M. B. *et al.* (2012) Novel teichulosonic acid from cell wall of *Streptomyces coelicolor* M145. *Carbohydr. Res.*, **359**:70–75.
- Alexandre, G. (2007) Dynamique des extremités du chromosome lineaire de *Streptomyces ambofaciens*. Université Henri Poincaré, Nancy-I.France, 144Pp.
- Alvarez, A., Saez, J. M., Davila Costa, J. S., Colin, V. L., Soledad Fuentes, M., Cuozzo, S. A., Benimeli, C.S. *et al.* (2017) Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* ,**166**: 41-62.
- Amano, S. I., Morota¹, T., Kano¹, Y. K., Narita¹, H., Hashidzume¹, T., Yamamoto¹, S., Mizutanil, K. *et al.* (2010) Promomycin, a polyether promoting antibiotic production in *Streptomyces* spp. *J. Antibiot.*, **63**: 486-491.
- Amore, A., Pepe, O., Ventrino, V., Birolo, L., Giangrande, C., Faraco, V. (2012) Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost. *Microb. Cell. Fact.*, **11**: 164.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., Manogaran, G. P. (2016) An Introduction to Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), In Tech, doi: 10.5772/62329. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnologicalapplications/an-introduction-to-actinobacteria>.

- Andrew, R. G. (2009) The biosynthesis of polyketide-derived polycyclic ethers. *Nat. Prod. Rep.*, **26**: 266–280.
- Angel, M., Ruben, A., Nuria, S., Paula, Y., Jesus, S. (2008) Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **74**(12): 3877-3886.
- Antoszczak, M. et Huczynski, A. (2015) Anticancer activity of polyether Ionophore Salinomycin. *Anti. Cancer Agents Med. Chem.*, **15**(5):575-91.
- Aouar, L., Lerat, S., Ouffroukh, A., Boulahrouf, A., Beaulieu, C. (2012) Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can. J. Plant. Pathol.*, **34**: 165-176.
- Aouiche , A., Sabaou, N., Meklet, A., Zitouni, A., Bijani, C., Mathieu, F., Labrihi, H. (2012) Sacharotrix sp. PAL54, a neu chloramphenicol producing strain isolated from Saharan soil. *Wrld. J. Microbiol. And Biotechnol.*, **28**: 943-951.
- Athalye, M., Lacey, J., Goodfellow, M. (1985) Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.*, **51**: 289-291.
- Baron, S., Leulmi, Z., Villard, C., Olumuyiwa Olaitan, A., Telke, A.A., Rolain, J.M. (2018) Inactivation of the *arn* operon and loss of aminoarabinose on lipopolysaccharide as the cause of susceptibility to colistin in an atypical clinical isolate of *Proteus vulgaris*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **51**: 450-457.
- Becke, A. D. (1993) Density-functional thermochemistry III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, **98**:5648-5652.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E., Lechevalier, H.A. (1964) Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, **12** : 421-423.
- Bell, R., Carmeli, S. (1994) Vibrindole A, a Metabolite of the Marine Bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*, Isolated from the Toxic Mucus of the Boxfish *Ostracion cubicus*. *J. Nat. Prod.*, **57**: 1587–1590.
- Bentley, S. D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Hariss, D.E. *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nat.*, **417**(6885):141-147.

- Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, **58**: 1-26.
- Berrada, R., Dauphin, G., David, L. (1987) Epinigericin, a new polyether carboxylic antibiotic. Structural determination by 2D NMR methods. *J. Org. Chem.*, **52**: 2391-2396.
- Birch, A., Hausler, A., Ruttener, C., Hutter, R. (1991) Chromosomal deletion and rearrangement in *Streptomyces glaucescens*. *J. Bacteriol.*, **173**(11):3531-3538.
- Bosso, J.A., Mauldin, P.D., Salgado, C.D. (2010) The association between antibiotic use and resistance : the role of secondary antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **29** :1125-1129.
- Bothwell, F.H.J. et Griffin, J.L. (2010) An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol. Rev.*, 000–000.
- Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F. (2005) Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, ELOued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J. Med. Mycol.*, **15**:39-44.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zrizer, H., Kitouni M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A. (2005) Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebka de Ain Mlila. *Sci. Technol. C.*, **0**:5-10.
- Bussari, B., Saudagar, P.S., Shaligram, N.S., Survase, S.A., Singhal R.S. (2008) Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**:49-58.
- C**allaway, T.R., Edrington, T.S., Rychlik, J.L., Genovese, K.J., Poole, T.L., Jung, Y.S., Bischoff, K.M. *et al.* (2003) Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, **4**: 43-51.
- Challis, G.L. (2008) Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, **154**: 1555-1569.
- Chamberlain, K. et Crawford, D.L. (2000) Thatch biodegradation and antifungal activities of two lignocellulolytic *Streptomyces* strains in laboratory cultures and in golf green turfgrass. *Can. J. Microbiol.*, **46**: 550-558.

- Chater, K.F., Biró, S., Lee, K. J., Palmer, T., Schrempf, H. (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *F E M.S. Microbiol. Rev.*, **34**:171-98.
- Chater, K.F. et Chandra, G. (2006) The evolution of development in *Streptomyces* analyzed by genome comparisons. *FEMS. Microbiol. Rev.*, **30**:651-72.
- Chen, X., Zhang, B., Zhang, W., Wu, X., Zhang, M., Chen, T., Liu, G. *et al.* (2013) Genome sequence of *Streptomyces violaceusniger* strain SPC6, a halotolerant Streptomycete that exhibits rapid growth and development. *Genome Announc.*, **1**(4): e00494-13.
- Choulet, F., Gallois, A., Aigle, B., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F.X. *et al.* (2006) Intraspecific variability of the terminal inverted repeats of the linear chromosome of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Bacteriol.*, **188**:6599-6610.
- Claudia, H., Kathrin, S., Christina, B., Elisabeth, I., Graeme, N., Alan, T. B., Amanda, L.J. *et al.* (2009) Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J. Antibiot.*, **62**: 99-104.
- Coombs, J.T. et Franco, C. M. M. (2003) Isolation and Identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (9) : 5603-5608.
- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M.A. (1993) Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(11) : 3899-3905.
- Crevelin, J. E., Crotti, M. E. A., Zucchi, T.D., Melo, I. S., Moraes, L. A. B. (2014) Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accuratemass electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **49**: 1117-1126.
- Cuer, A., Dauphin, G., Beloeil, J.C. (1983) Microbial conversion of grisorixin, a monovalent cation ionophorous antibiotic. *J. Antibiot.*, **36**: 20-24.
- D**avid, L., Leal Ayala, H., Tabet, J.C. (1985) Abierixin, a new polyether antibiotic. Production , structural determination and biological activities. *J Antibiot.*, **31**: 1655-1663.
- Dayu, Y., Fuchao, X., Jia, Z., Jixun, Z. (2012) Type III Polyketide Synthases in Natural Product Biosynthesis. *I.U.B.M.B. Life*, **64**(4): 285--95.

- Demayter, P., Leblond, P., Simonet, J.M., Decaris, B. (1988) Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**: 2001-2007.
- Deng, C.C., Liang, Y., Wu, M.S., Feng, F.T., Hu, W.R., Chen, L.Z., Feng, Q.S., Bei, J.X., Zeng, Y.X. (2013) Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell. B.*, **45**:1997-2006.
- Denser Pamboukian, C. R., Guimarães, L. M., Facciotti, M. C. R. (2002) Applications of image analysis in the characterization of *streptomyces olindensis* in submerged culture. *Braz. J. Microbiol.*, **33**: 17-21.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O. (2008) Phylogeny.Fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucl. acids res.*, **36** (Web Server issue):W465-W469.
- Dhanasekaran, D., Selvamani, S., Panneerselvam, A., Thajuddin, N. (2009) Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estury, Annagkoil, Tamilnadu. *Afric. J. Biotechnol.*, **8**: 4159-4162.
- Dirlam, J.P., Cullen, P., Huangetal, L.H. (1991) CP-91, 243 and CP91, 244, novel diglycosine polyether antibiotics related to UK58,852 and produced by mutants of *Actinomadura roseorufa*, *J. Antibiot.*, **44**: (11) 1262-1266.
- Djinni, I., Defant, A., Kecha, M., Mancini, I. (2013) Metabolite profile of marine-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis* WR1L1S8 by liquid chromatography-mass spectrometry and evaluation of culture conditions on antibacterial activity and mycelial growth. *J. Appl. Microbiol.*, **116**: 39-50.
- Dorkov, P., Pantcheva, I.N., Sheldrick, S.W., Mayer-Figge, H., Petrova, R., Mitewa, M. (2008) Synthesis, structure and antimicrobial activity of manganese(II) and cobalt(II) complexes of the polyether ionophore antibiotic Sodium Monensin A. *J. Org. Chem.*, **102** (1) : 26-32.
- Dréan, A., Goldwirt, L., Verreault, M., Canney, M., Schmitt, C., Guehenec, J., Delattre, J.Y., Carpentier, A., Idbah, A. (2016) Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma. *Expert. Rev. Neurother.*, **16**:1285-1300.
- Dutton, C.J., Banks, B. J., Cooper, C.B. (1995) Polyethers ionophores. *Nat. Prod. Rep.*, **12**: 165-181.

- Dvies, J. (2013) Specialized microbial metabolites: functions and origins. *J. Antibiot. Tokyo*, **66**:361-634.
- E**dmond, D. H. Vincent, S. (2007) Mass Spectrometry Principles and Applications. 3 edition. John Wiley and Sons. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. Pp502. <http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>.
- Eduardo, J.C., Antônio, E. M. C., Tiago, D. Z., Itamar, S. M., Luiz, A. B. M. (2014) Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate mass electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.*, **49**: 1117-1126.
- F**älärth, K., Buttner, M.J. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat.*, **7**:36-49.
- Francis, R., Annick, R., Daniel, C. (2004) analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes. 6 édition, Dunod, Paris, ISBN 2 10 048425 7. Pp 38.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. Tarkka, M. (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.*, **176**: 22–36.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery, J.A, *et al.* (2004) Gaussian Revision E.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT.
- G**achon, P. et Kergomard, A. (1975) Grisorixin, anionophorous antibiotic of the nigericin group. II Chemical and structural study of grisorixin and some derivatives. *J. Antibiot.*, **23**: 351-357.
- Gachon, P., Kergomard, A., Veschambre, H., Esteve, C., Staron, C. (1970) Grisorixin, a new antibiotic related to nigericin. *Chem. Commun.*, **21**: 1421-1422.
- Gaskell, S. J. (1997) Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.*, **32** : 677-688.
- Gong, Y., Chen, J., Yang, T., Li, Z., Li, G. (2010) Secondary metabolites with anti-Staphylococcus aureus activity from *Streptomyces hygrosopicus*. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, **16**: 261-263.

- Goodfellow, M., Kampfner, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., Withman, B. W. (2012) The actinobacteria in Bergay's manual of systematic bacteriology, **5** :1984-1989.
- Gordon, R.E. et Barnett, D.A. (1977) Resistance to rifampin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27** :176-178.
- Grably, S., Hammann, P., Klein, R., Seibert, G., Wiwnkler, I. (1992) Secondary metabolites by chemical screening. 17. Nigericin derivatives: synthesis, biological activities and Modelines studies. *J. Med. Chem.*, **35**(5):939-944.
- Guiraud, J.P. (1998) Techniques d'analyse microbiologique, dans Microbiologie alimentaire. *Dunod Paris*, 171-334.
- Gumila, C., Ancelin, M.L., Delort, A.M., Jeminet, G., Vialj, H. (1997) Characterization of the potent *in vitro* and *in vivo* antimalarial activities of ionophore compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**: 523-529.
- Gupta, P.B., Onder, T.T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R.A. (2009) Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, **138** (4): 645-59.
- H**amdali, H., Virolle, M. J, von Jan, M., Sproer, C., Klenk, H. P.O., Ouhdouch, Y. (2011) *Streptomyces youssoufiensis* sp. nov., isolated from a Moroccan phosphate mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**: 1104-1108.
- Han, X., Zheng, J., Xin, D., Xin Y., Wei X., Zhang, J. (2015) *Streptomyces albiflavescens* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**: 1467-1473.
- Haneda, M., Nawata, Y., Hayashi, T., Ando, K. (1974) Tetranactin, a new mitocidal antibiotic. vi determination of dinactin, trinactin and tetranactin in their mixtures by nmr spectroscopy. *J. Antibiot.*, **27** : 555.
- Haney, M. E., Hoehn, M.M. (1968) Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**:363-8.
- Hankin, L., Zucker, M., Sands, D. C. (1971) Improved solid medium for the detection and enumeration of pectinolytic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **22**: 205-209.

- Harrison, J., Studholme, J. D. (2014) Recently published *Streptomyces* genome sequences. *Microbial. Biotechnol.*, **7**(5) : 373-380.
- Harvey, B. M., Mironenko, T., Sun, Y., Hong, H. Deng, Z., Leadlay, P.F. Weissman, J. K. (2007) Insights into Polyether Biosynthesis from Analysis of the Nigericin Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137. *Chem. Biol.*, **14**: 703-714.
- Harvey, B.M., Hong, H., Jones A., M., Hughes-Thomas, A. A., Goss, R.M., Heathcot, M.L., Bolanoc-Garcia, M.V., *et al.* (2006) Evidence that a Novel Thioesterase is Responsible for Polyketide Chain Release during Biosynthesis of the Polyether Ionophore Monensin. *Chemio. Hem.*, **7**: 1435-1442.
- Hashimoto, M., Kondo, T., Kozone, I., Kawaide, H., Abe, H., Natsume, M. (2003) Relationship between response to and production of the aerial mycelium-inducing substances pamamycin-607 and A-factor. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **67**: 803-808.
- Hayakawa, M. (2008) Studies on the isolation of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetol*, **22**: 12-19.
- Hegazy, A. M., Yamada, D., Kobayashi, M., Kohno, S., Ueno, M., Ali, M.A.E., Ohta, K., *et al.* (2016) Therapeutic strategy for targeting aggressive malignant gliomas by disrupting their energy balance. *J. Biol. Chem.*, **291**: 21496-21509.
- Heuer, H., Kserk, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H. (1997) Analysis of Actinomycetes communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** : 3233-3241.
- Hilali, L., Khattabi, A., Nssarlah, N., Malki, A., Finance, C. (2002) Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotech.*, **2** (1) : 49-53.
- Hojae L., Tuan, M. N., Jaisoo, K. (2015) Isolation of Soil Actinobacterial Strains Showing Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, a Causative Agent of Stonebrood Disease in Honeybee. *Journal of Apiculture*, **30**(1) : 31-35.
- Hsu, S.C., Lockwood, J. L. (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for a enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.*, **29**: 422-426.
- Hucynski, A., Janczak, J., Lowick, D., Brzezinski, B. (2012) Monensin A acid complexes as a model of electrogenic transport of sodium cation. *B. B. A. Biomembranes*, **1818**(9) : 2108-2119.

- Huczynski, A., Stefa, J., Przybylski, P., Brzezinski, B., Bartl, F. (2008) Synthesis and antimicrobial properties of Monensin A esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18** (8) : 2585-2589.
- Huczynski, A. (2012) Polyether ionophores-Promising bioactives molecules for cancer therapy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**: 7002-7010.
- Hutchinson, C. R. (1999) Microbial polyketide synthases: More and more prolific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 33363338.
- Isaka, M., Boonkhao, B., Rachtawee, P., Auncharoen, P. (2007) A xanthocillin-like alkaloid from the insect pathogenic fungus *Cordyceps brunnearubra* BCC 1395. *J. Nat. Prod.*, **70** : 656-658.
- Jiang, J., Hailong, L., Eskandar, Q., Jing, Z., Yushu, S., Rong, W., Xinmiao, B., *et al.* (2018) Salinomycin, as an autophagy modulator– a new avenue to anticancer: a review. *J. E. C. C. R.*, **37**:26.
- Jimenez-Esquilin, T.M., Roane, A.E. (2005) Antifungal activities of actinomycetes strains associated with high altitude sagebrush rhizosphere. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **32**: 378-381.
- Jiao, Z., Hao, H., Xiaolong, W., Jian, L., Xiangshan, Z., Menghao, C., Yuanxing, Z. (2015) Optimization of Nutrients for Dinactin Production by a Marine *Streptomyces* sp. from the High Latitude Arctic. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **20**: 725-732.
- Juan Pablo, G.E., Jean Franco, C.,Valeria, R., Govind, C., Barbara, A., Juan A. A., Mervyn, J. B. (2015) The *Streptomyces leeuwenhoekii* genome: *de novo* sequencing and assembly in single contigs of the chromosome, circular plasmid pSLE1 and linear plasmid pSLE2. *B.M.C. Genomics*, **16**:485.
- Juana, P., José, M. D., Alfredo, F. B., Lawrence, J. S., Laura, S., Ramón I. S. (2011) *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microbial. Biotechnology*, **4**(2) : 175-183.
- Junyi, Z., Lin, Z., Yan, W., Chao, Y. (2010) HPLC-ELSD analysis of spectinomycin dihydrochloride and its impurities. *J. Sep. Sci.*, **34**:1811–1819.

- K**Andula, S. K., Terli, R. (2013) Production, purification, and characterization of an antimicrobial compound from marin streptomyces coeruleobidus BTSS- 301. *J. pharm. Res.*, **7** : 397-403.
- Karwowski, J.P., Jackson, M., Theriault, R.J., Chen, R.H., Barlow, G.J., Maus , M.L. (1989) Pacidamycins, a novel series of antibiotics with anti-*pseudomonas aeruginosa* activity Taxonomy of the producing organism and fermentation. *J. Antibiot.*, **42** (4):512-20.
- Katsuki, T., Sharpless, K.B. (1980) The first practical method for asymmetric epoxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**: 5974 -5974.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. (2000) Practical *Streptomyces* genetics, p.43-61. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Kim, W. K., Kim, J.H., Yoon, K., Kim, S., Ro, J., Kang, H.S., Yoon, S. (2012) Salinomycin, a pglycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest. *Investig New Drugs*, **30**(4):1311-1318.
- Kim, Y. M., et KIM, J. H. (2004) Formation and dispersion of mycelial pellets of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Microbiol.*, **42**:64-67.
- Kinkel, L. L., Schlatter, D. C., Bakker, M.G., Arenz, B. E. (2012) *Streptomyces* competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Res. Microbiol.*, **163**:490-499.
- Kirby, R., Sangal, V., Tucker, N.P., Zakrzewska-Czerwinska, J., Wierzbicka, K., Herron, P. R., Chu, C.J., *et al.* (2012) Draft genome sequence of the human pathogen *Streptomyces somaliensis*, a significant cause of actinomycetoma. *J. Bacteriol.*, **194** (13): 3544-3545.
- Kumar, S., Kaur, N., Singh, N.N.K., Raghava, G.P.S., Mayilraj, S. (2013) Draft genome sequence of *Streptomyces gancidicus* strain BKS 13-15. *Genome Announc.*, **1**:e0015013.
- Kumar, V., Bharti, A., Gusain, O., Singh, B.G. (2011) Scanning Electron Microscopy of *Streptomyces* without use of any Chemical fixatives. *Scanning*, **33** : 446-449.
- Kwan, E.E., Huang, G.S. (2008) Structural Elucidation with NMR Spectroscopy: Practical Strategies for Organic Chemists. *Eur. J. Org. Chem.*, 2671-2688.

- L**abeda, D.P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A.C., Lanoot, B., Vannanney, M., Swings, J., *et al.* (2012) Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **101**: 73-104.
- Laura, F. M., Bo, A., Chris, M., Inge, C. G., Anthony, D. S., Dominique, L. M., Otto, C. (2011) Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria-Time to react is now. *Drug Resis. Update*, **14**: 118-124.
- Leblond, P., Demuyter, P., Smonet, J. M., Decaris, B. (1990) genetic instability and hypervariability in *streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. *Mol. Microbial.*, **4**: 707-714.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H. (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**: 435-443.
- Lee, C., Yang, W., Parr, R.G. (1988) Development of the Colle-Salveti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.*,**37**:785-789.
- Leiminger, J., Frank, M., Wenk, C., Poschenrieder, G., Kellermann, A., Schwarzfischer, A. (2013) Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathol. J.*, **62** : 611-623.
- Li, S. Z., Li, X.Y.,Cui, Z.F., Wang, D.Z. (2004) Application of ultrafiltration to improve the extraction of antibiotics. *Sep. Purif. Technol.*, **34** : 115-123.
- Liao, G., Li, J., Li, L., Yang, H., Tian, Y., Tan, H. (2009) Selectively improving nikkomycin Z production by blocking the imidazolone biosynthetic pathway of nikkomycin X and uracil feeding in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microb. Cell. Fact.*, **8**: 61.
- Lin, L., Ge, H.M., Yan, T., Qin, Y.H., Tan, R. X. (2012) Thaxtomin A-deficient endophytic *Streptomyces* sp. enhances plant disease resistance to pathogenic *Streptomyces scabies*. *Planta*, **236**: 1849-1861.
- Lirong, H., Guoqiang, Z., Guopeng, M., Xing, Z., Juntao, F. (2015) *Streptomyces kanasensis* sp. nov., an Antiviral Glycoprotein Producing Actinomycete Isolated from Forest Soil Around Kanas Lake of China. *Curr. Microbiol.*, **71**(6):627-631.
- Loqman, S., Ait-Barka, E., Clément, C., Ouhdouch, Y. (2009) Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25** : 81-91.

- Lowicki, D. et Huczynski, A. (2013) Structure and Antimicrobial Properties of Monensin A and Its Derivatives. *Bio. Med. Research. International*, **2013**: 1-14.
- Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M. (2007) Evaporative light scattering detection: trends in its analytical uses. *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**:1663-1672.
- M**Aki, M.L., Broere, M., Tin Leung, K., Qin, W. (2011) Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, **2**(2):146-154.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., Sharma, P.K. (2010) High performance liquid chromatography: a short review. *J. G. P. T.*, **2**(5): 22-26.
- Manago, A., Leanza, L., Carraretto, L., Sassi, N., Grancara, S., Quintana-Cabrera, R., Trimarco, V., *et al.* (2015) Early effects of the antineoplastic agent salinomycin on mitochondrial function. *Cell Death Dis.*, **6** : e1930.
- March, R.E. (1997) An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.*, **32**: 351-369.
- Mc Bride, M. J., Ensign, J.C. (1986) Effect of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.*, **169**(11): 4995-5001.
- McCann, P.A., Pogell, B.M. (1979) Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *J. Antibiot.*, **32**: 673-678.
- McKenzie, N. L., Thaker, M., Koteva, K., Hughes, D. W., Wright, G. D., Nodwell, J. N. (2010) Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene abs A1. *J. Antibiot.*, **63**(4):177-82.
- McLuckey, S.A., Van Berkel, G.J., Goeringer, D.E., Glish, G.L. (1994) Ion trap mass spectrometry using high-pressure ionization. *Anal. Chem.*, **66** :737A-743A.
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. (2011) Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria: Isolation, Taxonomy and Antagonistic Properties. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **77** (18) : 6710-7614.
- Mouslim, J., Cuer, A., David, L., Tabet, J.C. (1993) Epigrisorixin, a new polyether carboxylic antibiotic. *J. Antibiot.*, **46**: 201-203.

- Mouslim, J., Cuer, A., David, L., Tabet, J.C. (1995) Biosynthetic study on the polyether carboxylic antibiotic, nigericin production and biohydroxylation of grisorixin by nigericin-producing *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. *J. Antibiot.*, **48**:1011-1014.
- Messoudi, O. (2013) Contribution à la caractérisation des souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de Kenadsa (Bechar). Thèse de Magistère en Microbiologie Appliquée. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. 78Pp.
- Michael, P. S., Kai, B., Michael, S. (2003) Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC–MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **375** (7): 942-947.
- MinKyun, N., Damaris, A. F. M., Dion, K., Mark, T. H., Matthew, A., Russell, T. H. (2008) A new antimalarial polyether from a marine *Streptomyces* sp. H668. *Tetrahedron Lett.*, **49**: 6282-6285.
- Mobolaji, F. A., Olubukola, O. B. (2013) Phylogenetic Characterization of Culturable Antibiotic Producing *Streptomyces* from Rhizospheric Soils. *Mol. Biol.*, **S1**:001.
- Mocheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S., Bogatzevska, N. (2002) Characteristics of actinomycetes from Antarctica. *J. Cult. Collect.*, **3**: 3-14.
- Mohammadipanah, F., Hamed, J., Sproer, C., Rohd, M., Montero-Calasanz, C., Klenk, H.P. (2014) *Streptomyces zagrosensis* sp. Nov., isolated from soil. *Int. Syst. Evo. Microbiol.*, **64**: 3434-3440.
- Mollenhauer, H.H., Morré, D.J., Rowe, L.D. (1990) Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1031**: 225-246.
- Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., Donadio, S. (2002) New PCR primers for the Selective amplification of 16S DNA from different groups of Actinomycetes. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **42**: 419-429.
- Montana, J.S., Jimenez, D.J., Hernandez, M., Angel, T., Baena, S. (2012) Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **101**: 205-215.

- Montesano, D., Cossignani, L., Giua, L., Urbani, E., Simonetti, M.S., Blasi, F. (2016) A Simple HPLC-ELSD Method for Sugar Analysis in Goji Berry. *Journal of Chemistry*. **2016**:5.
- Mukthi, T. (2016) A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *R.R.J.P.A.*, **5**(2): 22-28.
- Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Holt, J.G., Krieg, N.R., Mulder, J.W., Pfenning, N., Sneath, P.H., *et al.* (1989) In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*". Williams & Wilkins Eds. **4**: 2333-2648.
- Mythili, B., Ayyappa, M.P., Das, (2011) Studies on Antimicrobial Activity of *Streptomyces* spp. Isolates from Tea Plantation Soil. *R. J. A. S.*, **2**(1): 104-106.
- N**akamura, M., Kunimoto, S., Takahashi, Y., Naganawa, H., Sakaue, M., Inoue, S., Ohno, T., *et al.* (1992) Inhibitory effects of polyethers on human immunodeficiency virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**: 492-494.
- Nett, M., Ikeda, H., Moore, B.S. (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, **26**:1362-1384.
- Ng, Z. Y., Amsaveni, S. (2012) Isolation, Screening and Characterization of Antibiotic Producing Actinomycetes from Rhizosphere Region of Different Plants from a Farm of Sungai Ramal Luar, Malaysia. *J. A. B. P. A.*, **2**(3) : 96-107.
- Nicemol Jacob, K.N., Niladevi, G.S. and Anisha, P. (2006) Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *J. Microbil. Res.*, **163**: 538-544.
- Nurullhudda, Z., Ser, H. L., Yin, W. F., Tee, K. K., Lee, L. H., Chan, K. G. (2016) *Streptomyces humi* sp.nov., an actinobacterium isolated from soil of mangrove forest. *Antonie Van Leeuwenhoek* , **109** (3) :467 - 474.
- O**hnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A. *et al.* (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.*, **190**:4050-60.
- Ou, X., Zhang, B., Zhang, L., Dong, K., Liu, C. (2008) Sar A influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.*, **40**:877-882.

- Oikawa, H., Aihara, Y., Ichihara, A., Sakamura, S. (1992) Accumulation of grisorixin caused by treating a nigericin-producing strain with a P-450 inhibitor. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 684-684.
- Patrícia Bezerra, G., Markus, N., Hans-Martin, D., Isabel, S., Karin, M., Christian, H. (2010) Bezerramycins A–C, Antiproliferative Phenoxazinones from *Streptomyces griseus* Featuring Carboxy, Carboxamide or Nitrile Substituents. *Eur. J. Org. Chem.*, 231-235.
- Patrícia, B. G., Markus, N., Hans-Martin, D., Isabel, S., Karin, M., Christian, H. (2010) Bezerramycins A-C, Antiproliferative Phenoxazinones from *Streptomyces griseus* Featuring Carboxy, Carboxamide or Nitrile Substituents. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010** (2): 231-235.
- Paz, B., Daranas, H.A., Norte, M., Riobó, P., Franco, J.M., Fernández, J. J. (2008) Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Mar. Drugs*, **6**: 73-102.
- Peng, S., Katherine, N. M., Sang-Jip, N., Nina, M. H., Ritesh, R., William, A., Paul, R. J., *et al.* (2011) Fijimycins A-C, three antibacterial etamycin-class depsipeptides from a marine-derived *Streptomyces* sp. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**: 6557-6562.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., Brana, A.F., Shimkets, L.J., Sevillano, L., Santamaria, R.I. (2011) *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb. Biotechnol.*, **4**: 175-183.
- Pfeifer, T., Tuerk, J., Fuchs, R. (2005) Structural characterization of sulfadiazine metabolites using H/D exchange combined with various MS/MS experiments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**: 1687-1694.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., Van Der Putten, W. H. (2013) Going back to the roots : the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**: 789-799.
- Ping, X., Wen-jun, L., Wen-long, W., Ceng-lin, J. (2016) *Streptomyces hebeiensis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54** (3): 727-31.
- Pochon, J. et Tardieux P. (1962) Technique d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourtourelle, Saint-Mandé.

- Pospiech, A. et Neuman, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends. Gent.*, **11**: 217-218.
- Poulsen, M., Oh, D.C., Clardy, J., Currie, C.R. (2011) Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLoS ONE*, **6**(2): e16763.
- Prakasham, R. S., Sudheer, K. B., Vinay, B. T., Yaswanth, V. V. N., Jamal, A. (2014) Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. *B. J. M.*, **45**: 303-312.
- R**amon, S.A., Diaz, S.M., Sanz, D., Rodriguez, H. (2015) Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Front. Microbiol.*, **6** :1-8.
- Rateb, M.E., Houssen, W.E., Harrison, T.A., Deng, H., Okoro, C.K. , Asenjo, J.A., Andrews, B.A. *et al.* (2011) Diverse Metabolic Profiles of a *Streptomyces* Strain Isolated from a Hyper-arid Environment. *J. Nat. Prod.*, **74** : 1965-1971.
- Reddy, T.V.K., Mahmood, S., Mohamed Idris, M., Ciesielski, S. (2010) *Streptomyces osmaniensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60**: 1755-1759.
- Redenbach, M., Flett, F., Piendl, W., Glocker, I., Rauland, U., Wafzig, O., Kliem, R., *et al.* (1993) The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol. Gen. Genet.*, **241**(3-4): 255-262.
- Roege, K. E. et Kelly, W. L. (2009) Biosynthetic Origins of the Ionophore Antibiotic Indanomycin. *Organic. letters*, **11**: 297-300.
- Rudi Emerson, L.P., Ingrid, R. S., Mayra Kassawara, M., Juao Lucio, A., Janet Magali, A. (2012) Antibiotic produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.*, **16**(5):466- 471.
- Rueda, B., Miguelez, E. M., Hardisson, C., Manzanal, M. B. (2001) Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture. *Can. J. Microbiol.*, **47**:1042-1047.
- Russell, J.B. (1987) A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. *J. Anim. Sci.*, **64**(5) : 1519-1525.

- Rutkowski, J. et Brzezinski, B. (2013) Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics. *Bio. Med. Res. Int.*, ID 162513.
- S**allach, J.B., Snow, D., Hodges, L., Li, X., Bartelt-Hunt, S. (2016) Development and comparison of four methods for the extraction of antibiotics from a vegetative matrix. *Environ. Toxicol. Chem.*, **35**(4):889-97.
- Saunier, C., Godin, L. (2013) *Activité technologique en analyse biochimique*, E.T.S.L paris. Pp 5-50., <http://ligodin.free.fr>.
- Schlatter, D., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S., Kinkel, L. (2009) Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. *Microb. Ecol.*, **57**: 413-420.
- Schleifer, K., Kandler, H. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, **36**: 407-477.
- Ser, H. L., Zaina, N., Palanisamy, U.D., Goh, B.H., Yin, W.F., Chan, K.G., Lee, L.H. (2015) *Streptomyces gilvigriseus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from mangrove forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **107**: 1396.
- Shang, K., Youjia, H., Chunbao, Z., Boaquan, Z. (2008) Production of 4'-epidaunorubicin by metabolic engineering of *Streptomyces coeruleorubidus* strain SIPI-148. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**:1107-1113.
- Shibdas, B., Shyamalava, M. (2012) Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.*, **2012**: 1-40.
- Shirling, E.B. et Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **16** (3): 313-340.
- Silverstein, Webster, Kiemle (2007) *Identification spectrométrique de composés organiques*. 2e édition, Pp. 204-214.
- Singleton, P. (1999) *Bacteria in biology, bacteriology and medicine*. Wiley, Chichester UK: 236.

- Siwen, N., Sumei, L., Xinpeng, T., Tao, H., Jianhua, J., Xiaohong, Y., Si, Z., Changsheng, Z. (2011) Isolation and structural elucidation of secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. SCSIO 1934. *Chin. J. Chin. Mat. Med.*, **36**: 1768-1766.
- Soner, B., Gouranga, B., Shohei, O., Tomoya, K., Masahiro, S., Jun-ichi, H. (2014) Inflammatory responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells stimulated with an inflammasome-inducing agent, nigericin. *Dev. Comp. Immunol.*, **46** : 222-230.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N.L. (1997) Proposal for a new hierarchical classification system, actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**: 479-491.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New. Engl. J. Med.*, **352**:987-996.
- Suzuki, S., Nakanishi, E., Furihata, K., Miyamoto, K., Tsujibo, H., Watanabe, T., Ohnishi, Y., *et al.* (2008) Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces* generally. *Int. J. Biol. Macromol.*, **43**: 13-19.
- T**aechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran, W., Phutdhawong, W.S. (2013) Antibacterial activity of 1-methyl ester nigericin from *Streptomyces hygroscopicus* BR10: an endophyte in *Alpinia galanga*. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **3**:104-109.
- Takahashi, Y., Nakamura, H., Ogata, R., Matsuda, N., Naganawa, N., Takita, T., Litaka, Y. *et al.* (1990) Kijimicin, a polyether antibiotic. *J. Antibiot.*, **43**(4): 441-443.
- Tanasupawat, S., Phonqsopitanun, W., Suwanborirux, K., Ohkuma M., Kudo, T. (2016) *Streptomyces actinomycinidicus* sp.nov., isolated from soil of a peat swamp forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66** (1) :290-295.
- Tara, D. G., Chringma, S., Vishwanath, P. A., Binod, L. (2009) Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal. *J. Sci. Technol.*, **10** : 173-182.
- Thakur, D., Yadav, A., Gogoi, B.K., Bora, T.C. (2007) Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Myco. Med.*, **17**(4): 242-249.

- Thibessard, A., Haas, D., Gerbaud, C., Aigle, B., Lautru, S., Pernodet, J.L., Leblond, P. (2015) Complete genome sequence of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, the piramycin producer. *J. Biotechnol.*, **214**:117-118.
- Thibessard, A., Leblond, P. (2016) Complete Genome Sequence of *Streptomyces ambofaciens* DSM 40697, a Paradigm for Genome Plasticity Studies. *Genome Announc.*, **4**(3): e00470-16.
- Thomas, P. V. B., Charles, B., Marius, G., Bryan, T.G., Simon, A.L., Timothy, P.R., Aude, T. *et al.* (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceeding of the international academy of science of the united states of America*, **112** (18).
- Tiangang, L., Xin, L., Xiufen, Z., Zixin, D., David, E. C. (2008) Mechanism of Thioesterase-Catalyzed Chain Release in the Biosynthesis of the Polyether Antibiotic Nanchangmycin. *Chem. Biol.*, **15**: 449-458.
- Toshikazu, O., Yasue, M., Kohki, K., Akihiro, Y. (1981). New antracycline, feudomycins, produced by the mutant from *Streptomyces coeruleorubidus* ME130-A4. *J. Antibiot.*, **34**(7):783-90.
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol.*, **96** : 1151-1160.
- Trejo-Estrada, S. R., Paszczynski, A., Crawford, D. L. (1998) Antibiotics and enzymes produced by the biological control agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Ind. Microbiol. Technol.*, **21**:81-90.
- Tuomi, T., Heino, M., Nordstrom, K., Laakso, S. (2001) Fiber fractions from processing of barley in production and conservation of a biologic control agent. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **94** : 135-145.
- U**llah, I., Masood, A., Chuadhry, I. J. M., Noureen, U, Jadoon, W. A. (2012) Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Rec. Zool. Surv. Pakistan*, **21**: 10-13.
- Ulrich, A., Klimke, G., Wirth, S. (2008) Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application. *Microb. Ecol.*, **55**: 512-522.

- V**ilotijevic, I. et Jamison, T. F. (2009) Epoxide-Opening Cascades in the Synthesis of Polycyclic Polyether Natural Products. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**: 5250 -5281.
- Volff , J. N. et Altenbuchner J. (2000) A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *F.E.M.S. Microbiology Lett.*, **186**: 143-150.
- Volff, J. N. et Altenbuchner, J. (1998) Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.*, **27**(2): 239-246.
- Volff, J. N., Viell, P., Altenbuchner, J. (1997) Influence of disruption of the recA gene on genetic instability and genome rearrangement in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.*, **179**: 2440- 2445.
- W**aksman, S.A., Henrichi, A.T. (1948) Actinomycetaceae Buchanan and family Streptomycetaceae Waksman and Henrici. In: Breed R.S., Murray E.G.O. and Hitchens H.P. (Eds.) Bergey's manual of determinative microbiology, 6th ed. The William & Wilkins Co, Baltimore. 892-980.
- Wang, X.J., Zhang, J., Wang, J.D., Huang, S. X., Chen, Y.H., Liu, C. X., Xiang, W.S. (2011) Four new doramectin congeners with acaricidal and insecticidal activity from *Streptomyces avermitilis* NEAU1069. *Chem. Biodivers.*, **8**: 2117-2125.
- Wei Yee Chan, W., Hickey, E.E., Khazandi, M., Page, S.W., Trott, J.D., Hill, B.P. (2018) *In vitro* antimicrobial activity of narasin against common clinical isolates associated with canine otitis externa. *Vet. Dermatol.*, **29**(2):149-e57.
- Wei, C., Fei, H., Xiaojuan, Z., Zhi, C., Ying, W., Jilun, L. (2010) Chromosomal instability in *Streptomyces avermitilis*: Major deletion in the central region and stable circularized chromosome. *B.M.C. Microbiol.*, **10**:198.
- Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., Suzuki, K.-I. (2012) Bergey's manual of systematic bacteriology. The Actinobacteria, Part A. Volume 5, 2nd edition, Springer New York, Dordrecht Heidelberg London.
- Williams, S. T. et Davies, F.L. (1965) Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.*, **38**: 251- 261.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M., Vickers, J. C., Alderson, G., Sneath, P. H. A., Sackin M. J. *et al.* (1983)a A probability matrix for identification of some *Streptomyces*'s. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 1815-1830.

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

Wolfgang, H., Jonathan, B. S., Peter F. L. (2014) Intermediates in monensin biosynthesis: A late step in biosynthesis of the polyether ionophore monensin is crucial for the integrity of cation binding. *Beilstein J. Org. Chem.*, **10**: 361-368.

Xiao-Bing, L., Bin, Q., Ying-Jin, Y. (2006) Differential analysis of secondary metabolites by LC-MS following strain improvement of *Streptomyces lydicus* AS 4.2501. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **45** :107-118.

Xin, Z., Ting, G., Fu, L., Pei-Cheng, Z., Wan-Qi, Z., Yan, L., Ping, Z. (2015) A New Analogue of Echinomycin and a New Cyclic Dipeptide from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. LS298. *Mar. Drugs*, **13** : 6947-6961.

Xu, L., H., Tiang, Y. Q., Zhang, Y. F., L., Zhao, X., Jiang, C. L. (1998) *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**(4) :1089-1093.

Yakisich, J. S., Azad, N., Kaushik, V., O'Doherty, G.A., Iyer, A.K. (2017) Nigericin decreases viability of multidrug-resistant cancer cells and lung tumorspheres and potentiates the effects of cardiac glycosides. *Tumor Biol.*, **39** (3):1010428317694310.

Yakisich, J.S., Azad, N. K. V., O'Doherty, G. A., Iyer, A. K.V. (2017) Nigericin decreases viability of multidrug-resistant cancer cells and lung tumorspheres and potentiates the effects of cardiac glycosides. *Tumor Biol.*, **39**:1010428317694310.

Yilmaz, E.I., Yavuz, M., Kizil M. (2008) Molecular characterization of rhizospheric soil *Streptomyces* isolated from indigenous plants and their antimicrobial activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24** : 1461-1470.

Yim, G., Wang, H.H., Davies, J. (2007) Antibiotics as signaling molecules. *Philos. T. Roy. Soc. B.*, **362**: 1195-1200.

- Yu, T.W. et Chen, C.W. (1993) The unstable melC operon of *Streptomyces antibioticus* is codeleted with a Tn4811-homologous locus. *J. Bacteriol.*, **175**(6):1847-1852.
- Yuhui, S., Xiufen, Z., Jun, L., Kai, B., Guiming, Z., . Guoquan, T., Tobias, K. *et al.* (2002) *Streptomyces nanchangensis*, a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide) gene clusters. *Microbiology*, **148**, 361-371.
- Z**aburannyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A. (2014) Insights into naturally minimized *Streptomyces albus* J1074 genome. *B.M.C. Genomics*, **15**: 97.
- Zhang, Y. X., Denoya, C. D., Skinner, D. D., Fedechko, R. W., McArthur, H. A., Morgenstern, M. R., Davies, R. A. *et al.* (1999) Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. *Microbiology*, **145**: 23232334.
- Zhang, Y.L., Li, S., Jiang, D.H., Kong, L.C., Zhang, P. H., Xu, J.D. (2013) Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02. *J. Agric. Food Chem.*, **61**: 1521-1524.
- Zhao, X. Q., Li, W. J., Jiao, W. C., Li, Y., Yuan, W. J., Zhang, Y. Q., Klenk, H. P. *et al.* (2009) *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.*, **59**: 2870-2874.
- Zhao, X.Q., Li, W. J., Jiao, W.C., Li, Y., Yuan, W. J., Zhang, Y. Q., Klenk, H. P., Suh, J. W. *et al.* (2009) *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**: 2870-2874.
- Zhou, Z., Gu, J., Li, Y.Q., Wang, Y. (2012) Genome plasticity and systems evolution in *Streptomyces*. *B.M.C. Bioinformatics*, **13** (Suppl. 1): S8.
- Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2004) Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 1 03. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, **57**: 367-372.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures utilisés

1. Milieu Olson		2. Milieu YMEA + CaCO ₃	
Sodium casein	2g	Extrait de levure	4g
L aspragine	0,1g	Extrait de malt	10g
Sodium propionate	4g	Glucose	4g
K ₂ HPO ₄	0,5g	CaCO ₃	1g
FeSO ₄	0,01g	Agar	20g
agar	10g	Eau distillée	1000ml
Eau distillée	1000g	pH = 7,3	
pH=7,2			
3. Milieu ISP ₁		4. Milieu ISP ₂ (YMEA)	
Tryptone	5g	Extrait de levure	4g
Extrait de levure	3g	Extrait de malt	10g
Eau distillé	1000ml	Glucose	4g
		Agar	20g
PH = 7,3		Eau distillée	1000ml
		PH = 7,3	
5. Milieu ISP ₅		6. Milieu ISP ₆	
Asparagine	1g	Péptone	15g
Glycérol	10g	Protéose peptone	5g
K ₂ HPO ₄	1g	Citrate de fer	0,5g
Solution	1g	ammoniacal	1g
d'oligoéléments **	1g	Phosphate dipotassique	0,08g
Agar	20g	Sodium thiosulfate	1g
Eau distillée	1000ml	Extrait de levures	15
		Agar	1000ml
		Eau distillée	
		PH=7,2	
7. Milieu ISP ₇		8. Milieu ISP ₉	
Glycérol	15g	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64g
L- tyrosine	0,5g	KH ₂ HPO ₄	2,38g
L-asparagine	1g	K ₂ HPO ₄	5,65g
K ₂ HPO ₄	0,5g	MgSO ₄ 7 H ₂ O	1g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5g	Solution d'oligoéléments	1g
NaCl	0,01	Agar	15g
FeSO ₄ 7H ₂ O	20g	Eau distillée	1000ml
Eau distillée	1000ml	PH=7,4	
PH=7,4			

9. Milieu Mueller Hinton

Extrait de viande
Hydrolysate acide de caséine
Amidon
Agar
Eau distillée
PH=7,4

2g
17,5g
1,5g
10g
1000ml

10. Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Glucose
Pomme de terre
Agar
Eau distillée
PH=6,5

20g
200g
15g
1000ml

11. Milieu Bennett

D-Glucose anhydre
Casaminoacide
Extrait de levure
Extrait de viande
Agar
Eau distillée
PH=7,4

10g
2g
1g
1g
15g
1000ml

12. Milieu Bennett (modifié)

Glycérol
Extrait de levure
NZ amine (Casein digest)
Extrait de viande
Agar
Eau distillée

10g
1g
2g
1g
20g
1000ml

PH=7,3

13. Milieu SCA (*Starch casein Agar*)

Amidon
KNO₃
K₂HPO₄
NaCl
Caséin
MgSO₄ 7H₂O
CaCO₃
FeSO₄ 7 H₂O
Agar
Eau distillée
pH =7.5

10g
2g
2g
2g
0,3g
0,05
0,02
0,01
20
1000ml

14. Milieu Gausse modifié

Amidon
K₂HPO₄
MgSO₄ 7H₂O
KNO₃
Agar
Eau distillée
PH=7,4

20g
0,5g
0,5g
1g
20g
1000ml

15. Milieu CCA (*Colloidal Chitin Agar*)

Chitine
KH₂PO₄
K₂HPO₄
MgSO₄ 7H₂O
MnCl₂
FeSO₄ 7 H₂O
ZnSO₄
Agar
Eau distillée
PH=7,3

20g
0,3g
0,7g
0,5g
0,001g
0,01g
0,01g
20g
1000ml

16. Milieu SMK (*krasilnikov's synthetic agar*)

K₂HPO₄
MgSO₄
NaCl
KNO₃
FeSO₄
CaCO₃
Glucose
Agar
Eau distillée
PH=7,3

3g
0,3g
0,2g
1g
0,01g
0,5g
20g
20g
1000ml

17. Milieu Pectin agar

Pectine	5g
Extrait de levure	5g
Eau distillée	1000g
Agar	20g
pH=7	

18. Milieu Sierra

Tryptone	3g
Extrait de levure	5g
Glucose	
Tween	5g
CaCl ₂	1%
Agar	0,01%g
Eau distillée	20g
pH = 7	1000ml

19. CMC (Carboxy méthyl Cellulose)

Extrait de levure	0,2g
Glycérol	2ml
CMC(Carboxy Méthyl Cellulose)	10g
Agar	20g
pH:7,3	
(Ajouter le CMC progressivement sous agitation et à une température d'environ 60°C)	

Annexe 2 : Les solutions

1. Solution d'oligo-éléments**

FeSO ₄ 7 H ₂ O	0,1g
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,1g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,1g
Eau distillée	100ml

2. Solution d'oligo-éléments***

FeSO ₄ 7 H ₂ O	0,11g
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,79g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,15g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,64g
Eau distillée	100ml

3. Solution d'avoine

Grains d'avoine pilés	20g
Eau distillée	1000ml

Faire bouillir pendant 20mn Filtrer sur gaze et réajuster le volume à 1000ml

4. Solution iodine

KI	2g
I ₂	1g
Eau distillée	300ml

5. Solution de Mac Farland

Solution de BaCl ₂ . 2H ₂ O, 1%	0,6ml
Solution de H ₂ SO ₄ , 1 %	99,4ml

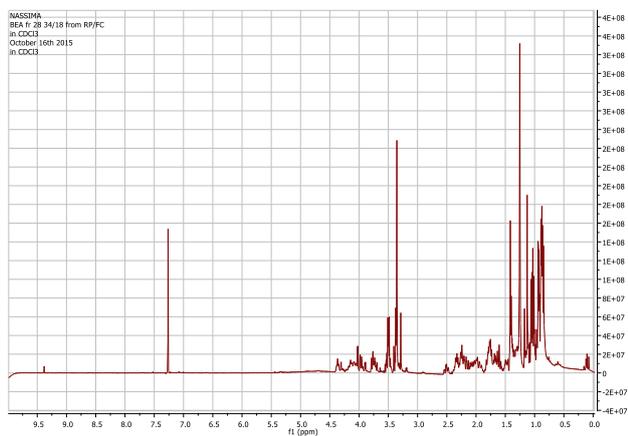
Annexe 3 : les spectres RMN

Figure 01: spectre RMN ¹H (CDCl₃) de la molécule M4 produit par la souche *S. youssoufiensis* SF10.

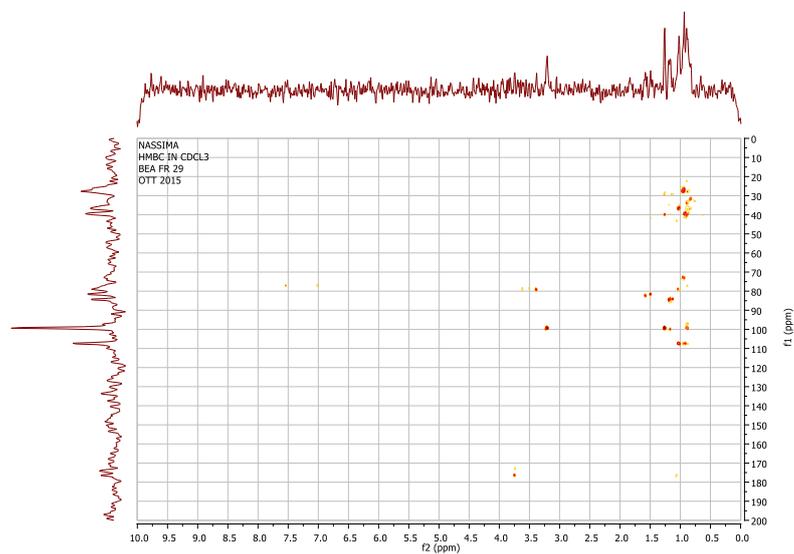


Figure 02 : spectre de corrélations ¹H-¹³C (HMBC) de la molécule M4.

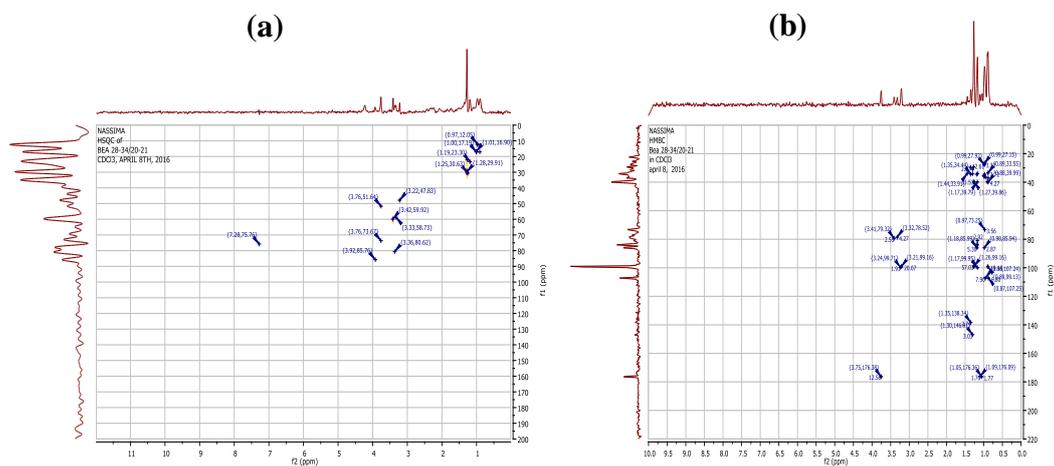
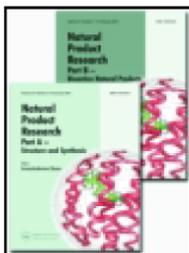


Figure 03: spectre de corrélations ^1H - ^{13}C (HSQC) (a) et ^1H - ^{13}C (HMBC) (b) de la molécule M6.

ARTICLE



Nigericin and grisorixin methyl ester from the Algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain: a computational study on their epimeric structures and evaluation of glioblastoma stem cells growth inhibition

Nassima Leulmi, Denise Sighel, Andrea Defant, Karima Khenaka, Abderrahmane Boulahrouf & Ines Mancini

To cite this article: Nassima Leulmi, Denise Sighel, Andrea Defant, Karima Khenaka, Abderrahmane Boulahrouf & Ines Mancini (2018): Nigericin and grisorixin methyl ester from the Algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain: a computational study on their epimeric structures and evaluation of glioblastoma stem cells growth inhibition, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2018.1446014](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1446014)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1446014>

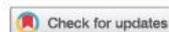
 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 07 Mar 2018.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)



Nigericin and grisorixin methyl ester from the Algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain: a computational study on their epimeric structures and evaluation of glioblastoma stem cells growth inhibition

Nassima Leulmi^{a,b,c}, Denise Sighel^{a,d}, Andrea Defant^a, Karima Khenaka^b, Abderrahmane Boulahrouf^b and Ines Mancini^a 

^aBioorganic Chemistry Laboratory, Department of Physics, University of Trento, Trento, Italy; ^bMicrobiological Laboratory Engineering and Application, Department of Microbiology, Mentouri Brothers University, Constantine, Algeria; ^cDepartment of Cellular and Molecular Biology, University Abbes Laghrour Khenchela, Khenchela, Algeria; ^dCentre for Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Trento, Italy

ABSTRACT

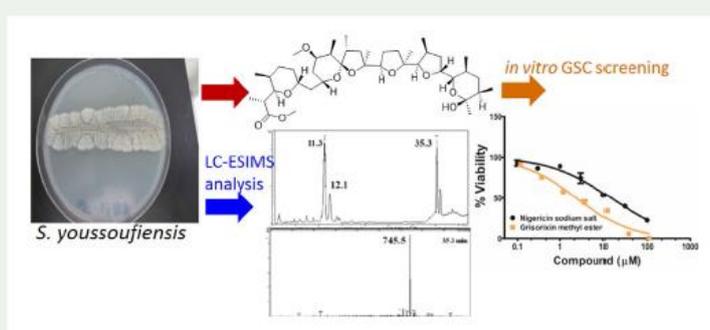
The present work describes the metabolites produced by a strain identified as *Streptomyces youssoufiensis*, whose secondary metabolites profile has not been studied so far. The crude ethyl acetate extract was analyzed by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, leading to the detection of the ionophoric polyethers nigericin, epinigericin, abierixin and the newly isolated grisorixin methyl ester. The presence of epimeric forms of nigericin/epinigericin and grisorixin/epigrisorixin has spurred density functional theory computational calculations. This analysis was able to provide the relative stability of the most favored epimers, setting the basis for general structural considerations applicable to several other polyethers. Both nigericin sodium salt and grisorixin methyl ester showed to affect glioblastoma stem cells proliferation in a dose-dependent manner, with a higher activity for the more lipophilic grisorixin methyl ester (GI_{50} values of 3.85 and 3.05 μM for VIPI and COMI human glioblastoma stem cells, respectively).

ARTICLE HISTORY

Received 12 January 2018
Accepted 22 February 2018

KEYWORDS

Streptomyces; HPLC-ESI/MS; polyethers; DFT calculation; cytotoxicity; glioblastoma



CONTACT Ines Mancini  ines.mancini@unitn.it

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1446014>.

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

Actinobacteria living in terrestrial habitats have been widely investigated for the production of bioactive metabolites which represent promising candidates for the development of new and selective antibiotic and antitumor agents. About 120 ionophore polyether antibiotics have been isolated from *Streptomyces*, which is the largest genus of Actinobacteria with over 500 species characterized (Dutton et al. 1995; Rutkowski and Brzezinski 2013). The structures of these metabolites display cyclic ethers and branched-chains with terminal carboxylic groups, and are characterized by the presence of several stereogenic centers (Bamdad et al. 1995). Due to their capability of binding monovalent or multivalent cations, they form lipid soluble complex (Sun et al. 2003) able to transport metal cations across cell membranes, therefore causing loss of membrane integrity and subsequent cell death (Smith et al. 2008).

The polyether nigericin is produced by various *Streptomyces* strains (Taechowisan et al. 2013) and displays a broad spectrum of activity, including strong antibacterial properties, whereas the related metabolites grisorixin and abierixin exhibit weak activity against Gram positive bacteria (Rutkowski and Brzezinski 2013). Both nigericin and epinigericin show similar activity against *Toxoplasma gondii*, which is lower for abierixin (Couzinet et al. 1994). Polyethers have also been shown to possess antitumor properties. For instance, nigericin is able to suppress colorectal cancer metastasis (Zhou et al. 2012), to inhibit proliferation of multidrug-resistant lung cancer cells (Yakisich et al. 2017) and to block proliferation of cancer stem cells (Deng et al. 2013; Hegazy et al. 2016). Recently, abierixin has shown a cytotoxic effect in A549, K562 and MCF-7 cells with micromolar IC₅₀ values (Wang et al. 2017). Moreover, the more widely studied salinomycin and monesin inhibit cancer stem cells proliferation and resulted to be toxic for chemoresistant cancer cells (Huczynski 2012). Based on these data, polyether ionophores are considered good candidates as anticancer drugs.

Among all the types of primary brain tumors, glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant. Despite the aggressive treatments standardly used, the survival of the patients remains poor (Stupp et al. 2005) therefore highlighting the urgent need for new, more effective molecules. The presence of chemo- and radiotherapy poorly responsive glioblastoma stem cells (GSCs) within the heterogeneous glioblastoma population has been indicated as responsible for the high malignancy of this tumor. GSCs not only promote tumor initiation, growth and angiogenesis but are also resistant to the conventional therapies, therefore contributing to the failure of the treatments used in the clinic. In fact, it has been demonstrated that the limited effect of temozolomide, currently the most widely used drug in GBM treatment, can be largely ascribed to the GSCs population (Zhou et al. 2015). Therefore, GSCs efficient eradication is a critical step to achieve a successful therapy for GBM and new drugs targeting this specific cell population may lead to significant improvement in the treatment of this aggressive brain tumor.

In the present work we described (i) the LC-MS analysis of the metabolite profile of a *Streptomyces* strain obtained from a semi-arid Algerian soil, (ii) the isolation and structural characterization of polycyclic polyethers including nigericin and the newly isolated grisorixin methyl ester (iii) the computational study on the structural epimerization of nigericin and grisorixin and (iv) the evaluation of the cytotoxic effect of the most abundant polyether metabolites on glioblastoma cancer stem cells *in vitro*.

2. Results and discussion

2.1. Taxonomic identification of the strain

Due to the temperature, radiation and salt concentration conditions, arid and semi-arid areas are peculiar ecosystems able to affect the metabolite profile of the extremophilic Actinobacteria, which have been slightly studied so far (Mohammadipanah and Wink 2016). The Actinobacteria colonies investigated in the present study were collected from an Algerian semi-arid soil and the SF10 strain was selected due to its ability of inhibiting pathogenic bacteria. Based on morphological, physiological and chemical evidences, the strain was characterized as belonging to the *Streptomyces* genus. Scanning electron microscopy (SEM) showed that it formed a pale yellow aerial mycelium with rectiflexible spore chains bearing smooth-surfaced spores (Figure S1). The SF10 strain physiological and biochemical features are reported in Table S1. The SF10 strain sequence was deposited in the GenBank database under accession number KU 373054. BLAST analyses revealed a similarity of 99.8% between the partial 16S rRNA gene sequence of this strain and that of *Streptomyces youssoufiensis* strain (FT421338) that has been previously isolated from a Moroccan phosphate mine in Youssoufia (Hamdali et al. 2011) and deposited in the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM 41920 code). *S. youssoufiensis* resulted very close to *S. zagrosensis* recently isolated from an Iranian soil (Mohammadipanah et al. 2014).

2.2. Metabolite profile by LC-ESI-MS/MS analysis of the crude extract

An online HPLC-MS/MS analysis (RP18, MeOH/H₂O + 0.1% trifluoroacetic acid, TFA) was performed on crude ethyl acetate extract obtained from the strain grown in solid state fermentation as single culture in Bennett's medium supplemented with glucose as carbon source at pH 7. The peaks at 11.3 and 12.1 min corresponded to the same [M + Na]⁺ ion at *m/z* 747.5 (Figure S2(a)), indicative of isomeric compounds. Tandem fragmentation experiments showed a fragment at *m/z* 729.4 attributable to [M-H₂O + Na]⁺, whereas the loss of carbon dioxide from the [M-H]⁻ ion at *m/z* 723 indicated the presence of a carboxylic group. The peak at 11.3 min was assigned to nigericin (**2**, Figure 1) by comparison with a commercial sample of nigericin sodium salt (Figure S2(b)). The peak at 12.1 min was attributed to epinigericin (**3**, Figure 1), showing inverted configuration at C-28 compared to nigericin (Berrada et al. 1987), as confirmed by next injection of the purified metabolite. The signal at 35.3 min associated to *m/z* 745.5 (Figure S2(c)) was identified as grisorixin methyl ester (**4**, Figure 1) after preparative HPLC purification and structural characterization.

2.3. Purification and structural identification of the metabolites

The crude EtOAc extract (0.80 g) gave pure metabolites after a sequence of chromatographic separations (Scheme S1). Abierixin (**1**, Figure 1) was isolated in very small amount and identified by comparison with reported data (David et al. 1985, Supplementary). Nigericin (**2**) and the minor epinigericin (**3**) were identified by comparing the MS and NMR data to those previously reported (Taechowisan et al. 2013, Supplementary). The relative amounts of the isolated metabolites (Scheme S1) were in line with the 75:25 ratio, for nigericin and epinigericin respectively, observed in the total ion chromatogram in the LC-MS analysis.

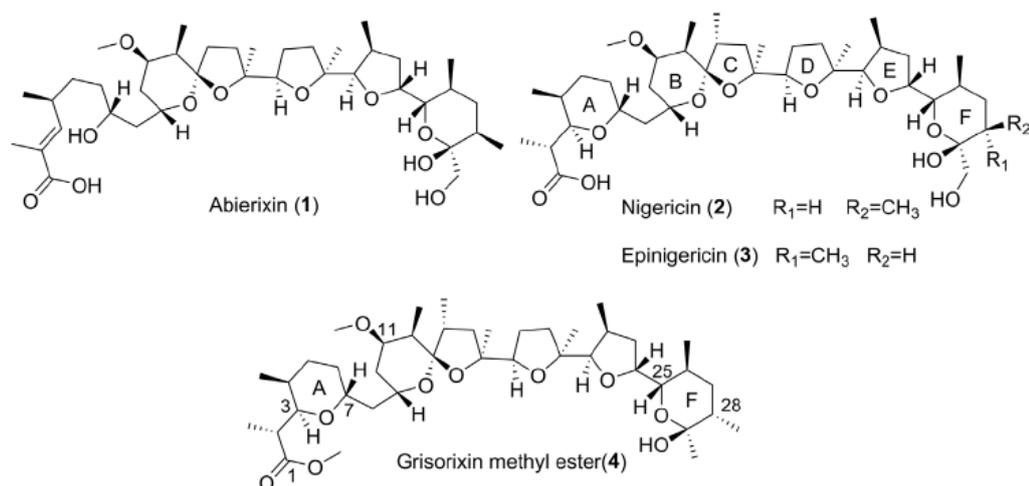


Figure 1. Molecular structures of polyethers isolated from the *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain.

For grisorixin methyl ester (**4**, Figure 1), HR-ESIMS experiments revealed a composition of $C_{41}H_{70}O_{10}$ by the values m/z 745.48526 (Calcd 745.486120) for $[M + Na]^+$ ion and m/z 721.48169 (Calcd 721.489622) for $[M-H]^-$ ion. The molecular structure was defined upon comparison with NMR data reported for grisorixin (Gachon et al. 1970; Cuer et al. 1983; Oikawa et al. 1992) and epigrisorixin (Mouslim et al. 1993). ^{13}C NMR spectra allowed to distinguish between grisorixin and epigrisorixin, which present chemical shift changes for the carbons belonging to the F-ring unit, especially for the C26–C28 signals undergoing a marked upfield shift (C26 signal goes from 32.9 to 25.3 ppm) (Mouslim et al. 1993). We found ^{13}C NMR signals attributable to the F-ring unit that are superimposable to the data reported for grisorixin in $CDCl_3$ (Oikawa et al. 1992). The replacement of the carboxylic unit with a methyl ester was confirmed by HMBC experiment, where the singlet at 3.72 ppm, assigned to the COOMe group, correlates with the only detected signal in the C=O region at 176.4 ppm. The intense IR band at 1725 cm^{-1} assigned to the carboxylic C=O present in the grisorixin structure (Cuer et al. 1983) was replaced by a strong band at 1739 cm^{-1} attributed to the ester group. Grisorixin methyl ester has not been previously isolated as a metabolite, but it has been reported as a grisorixin derivative in an oxidation reaction of the natural product (Gachon and Kergomard 1975). LC-ESIMS profile of the crude extract (Figure S2) dispelled the doubt that the presence of a methyl ester in the structure of metabolite **4** could be an artifact due to the isolation procedures. In fact, **4** was detected as methyl derivative whereas nigericin and epinigericin as free acids, under the same chromatographic conditions. As a further support, 1-methyl ester–nigericin, showing a similar COOMe unit as compound **4**, has been reported as a metabolite isolated by elution from a silica gel column using hexane/ethyl acetate (Taechowisan et al. 2013).

2.4. Computational analysis on the structural epimerization

The concomitant isolation of nigericin/epinigericin and grisorixin/epigrisorixin could be explained by a biosynthetic process involving an enzymatic pathway in a detoxification process as occurring in *S. hygroscopicus* (Mouslim et al. 1993). In order to identify the most stable form we have therefore evaluated the energy values associated to the different

isomers. Density functional theory (DFT) calculations are able to provide energy-minimized structures and their energy values. More specifically, a study of the energy values associated to each isomer enables to identify the thermodynamically favored epimeric molecule. An effective example of the use of DFT method to study epimers has been recently reported for gluco- and galactoside derivatives, differing in their stereochemical arrangement of a hydroxyl group (Ahmadi et al. 2017). To facilitate the calculations, we considered simplified molecules as model for the F-ring of nigericin and grisorixin structures. Specifically, 2-(hydroxymethyl)-3,5,6-trimethyltetrahydro-2H-pyran-2-ol was selected for the nigericin-like series and 2,3,5,6-tetramethyltetrahydro-2H-pyran-2-ol for the grisorixin-like series. The energy values of the models obtained from the computational analysis at a B3LYP/6-31G(d,p) level of theory for nigericin or grisorixin were compared with epinigericin or epigrisorixin respectively and those of their corresponding C-29 isomers. The data were obtained *in vacuo* and in water conditions, the latter one considered more representative of the biological environment. In the nigericin-like series, epinigericin unit has been shown to be slightly more stable than nigericin ($\Delta E = 0.4129$ kJ/mol *in vacuo* and $\Delta E = 2.5992$ kJ/mol in water), whereas the structures showing inverted configuration at the C-29 emiacetalic centre resulted significantly less stable if compared to nigericin ($\Delta E = 5.4877$ kJ/mol *in vacuo* and $\Delta E = 6.2003$ kJ/mol in water). In the grisorixin-like series, the grisorixin configuration at F-ring has resulted the most stable if compared with the C-28 epimer epigrisorixin ($\Delta E = 9.9357$ kJ/mol *in vacuo* and $\Delta E = 6.1825$ kJ/mol in water), and especially with the C-29 epimeric forms of both grisorixin and epigrisorixin (Table S2). These data could provide a thermodynamic explanation of the epimerization process occurring in these metabolites. The C-28 epimers, epinigericin and epigrisorixin, are both reported in literature as isolated metabolites, whereas the corresponding isomers coming from the emiacetalic epimerization at C-29 have not been isolated so far, in line with their higher energy values obtained by calculation. These considerations are of general interest and can be applied to the wide class of naturally occurring polycyclic polyethers. In fact, the F-ring structural moiety considered for nigericin is also present in endusamycin, CP-120509, monensin, laidlomycin, octacyclomycin, moyukamycin X-14931A, and the one considered for grisorixin is shown in mutalomycin, senduramycin, emduramicin, CP-91243, CP-91244 and W341C (Rutkowski and Brzezinski 2013).

2.5. *In vitro* cytotoxicity

It has been recently shown that nigericin is able to disrupt glioma cells' energy balance and to suppress malignant phenotypes of human patient-derived GBM cells both *in vitro* and *in vivo* (Hegazy et al. 2016). Based on the therapeutic potential of nigericin for human GBM treatment, it was worth to evaluate the cytotoxic activity of the newly isolated grisorixin methyl ester (**4**) in comparison with nigericin (**2**). In particular, the commercially available nigericin sodium salt has been used rather than the free acid form because the conjugated base is effectively present at pH 7.4 used in the assay, as supported by ChemSketch calculation (99.93% at pH 7.40). It is to note that the presence of TFA during the HPLC purification affected the isolation of the free acid form, but both nigericin and its carboxylate salt are reported as isolated metabolites (Wang et al. 2017).

Two glioblastoma stem cell lines, namely COMI and VIPI lines, were treated with increasing concentration of nigericin sodium salt or grisorixin methyl ester for 48 h. The cells were subsequently stained with Hoechst 33342 and propidium iodide (PI) and analyzed using

Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer). The number of living cells upon each treatment was estimated by counting the total number of cells stained using Hoechst and subtracting PI positive cells. Dose-response curves were plotted and growth inhibition 50 (GI_{50}) values were calculated as a parameter to evaluate cytotoxicity. Figure 2 shows that both the compounds affected cell viability in a dose-dependent manner. The calculated GI_{50} values resulted in 14.40 ± 3.24 and 12.60 ± 2.30 μM for nigericin sodium salt, and in 3.05 ± 0.92 and 3.85 ± 0.78 μM for grisorixin methyl ester, on COMI and VIPI respectively. The data indicate that grisorixin methyl ester is at least three times more potent in inhibiting glioblastoma stem cells proliferation as compared to nigericin sodium salt, besides being at least ten times more efficient than temozolomide included in the assay as a positive control (data not shown).

An effective treatment of GBM requires targeting of the cancer stem cell compartment by molecules able to cross the blood-brain barrier (BBB). Polar surface area (PSA) is one of the most important parameters used to characterize the transport properties of drugs, giving a very good correlation with BBB penetration (Dréan et al. 2016). *In silico* data prediction performed by MarvinSketch software provided the values of 145.20 \AA^2 for nigericin sodium salt, 142.37 \AA^2 for its free acid, 131.37 \AA^2 for its methyl ester and 111.14 \AA^2 for grisorixin methyl ester. The value obtained for grisorixin methyl ester is closer to the value of 105.94 \AA^2 obtained for temozolomide, which is known to cross the BBB. The preliminary results reported here confirm the potential use of polyethers as anticancer drugs (Huczynski 2012), suggesting that even small structural modifications could improve their potency and the BBB penetration capacity.

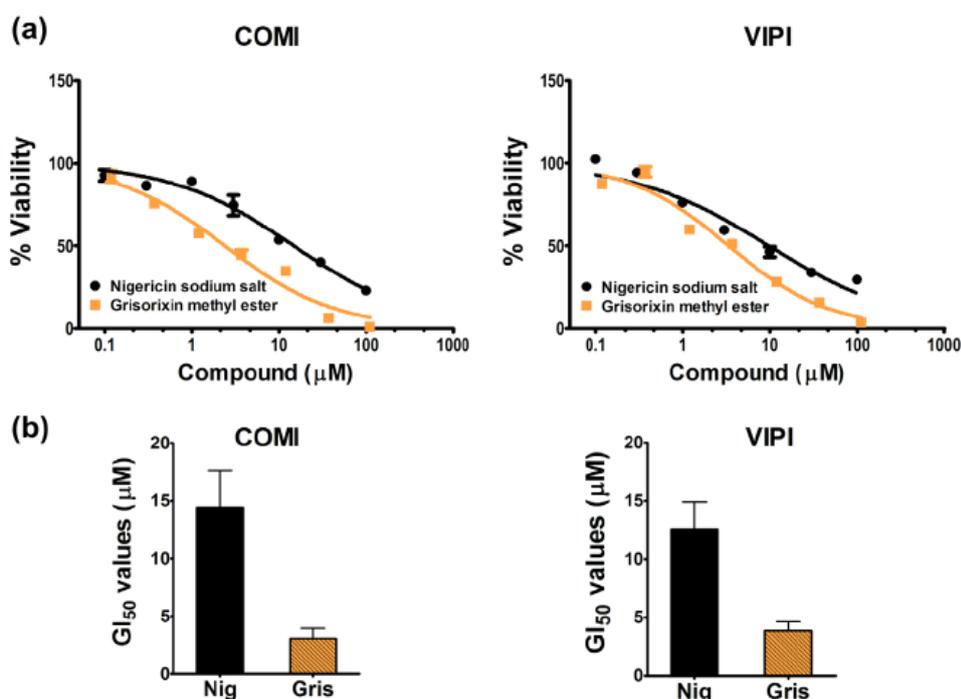


Figure 2. (a) Dose-response curves of human glioblastoma stem cells (COMI and VIPI) treated with nigericin sodium salt or grisorixin methyl ester. The metabolites affect cell proliferation in a dose-dependent manner. (b) Calculated GI_{50} values for nigericin sodium salt and grisorixin methyl ester. The GI_{50} value is defined as the compound concentration causing the 50% inhibition of the cell growth.

3. Conclusion

The polycyclic polyethers nigericin (**2**) and grisorixin methyl ester (**4**) have been isolated, purified and characterized as the major metabolites, together with abierixin (**1**) and epinigericin (**3**), from the strain SF10 collected in an Algerian semi-arid soil and identified as *S. youssoufiensis*. Moreover, the grisorixin methyl ester (**4**) has never been previously described as a natural product. Density functional theory (DFT) calculations allowed us to compare the relative stability of nigericin and grisorixin epimeric forms and set the basis for general structural considerations applicable to several other polyethers. The clear antiproliferative activity of grisorixin methyl ester on glioblastoma stem cells represents a promising starting point for further structure activity relationship (SAR) investigation aimed to the development of new drug candidates in the treatment of glioblastoma multiforme.

Supplementary material

Experimental details, together with Figures S1, S2, Tables S1, S2 and Scheme S1 related to this paper are available online.

Acknowledgements

N. L. is grateful for grants provided by the scholarship program sustained by the Algerian Ministry of Higher Education. The authors thank Adriano Sterni, Mario Rossi Nicola Bazzanella at University of Trento for their technical support. Many thanks to Antonio Daga, San Martino Hospital in Genova (Italy) for cell lines gift, to Alessandro Quattrone, Director of CIBIO, for the access to the facilities and to Alessia Soldano for reading the manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Ines Mancini  <http://orcid.org/0000-0003-0297-3685>

References

- Ahmadi S, ManickamAchari V, Hussain Z, Hashim R. 2017. Epimeric and anomeric relationship of octyl- α - d -gluco/galactosides: insight from density functional theory and atom in molecules studies. *Comput Theor Chem.* 1108:93–102.
- Bamdad M, David L, Grolière CA. 1995. Epinigericin toxicity towards *Tetrahymena pyriformis* GL; changes in cell volume and intracellular pH. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44:206–209.
- Berrada R, Dauphin G, David L. 1987. Epinigericin, a new polyether carboxylic antibiotic. Structural determination by 2D NMR methods. *J Org Chem.* 52:2388–2391.
- Couzinet S, Dubremetz JF, David L, Prensier G. 1994. *Toxoplasma gondii*: activity of the polyether ionophorous antibiotic nigericin on tachyzoites in cell culture. *Exper Parasitol.* 78:341–351.
- Cuer A, Dauphin G, Beloeil JC. 1983. Microbial conversion of grisorixin, a monovalent cation ionophorous antibiotic. *J Antibiot.* 36:20–24.
- David L, Leal Ayala H, Tabet JC. 1985. Abierixin, a new polyether antibiotic. Production, structural determination and biological activities. *J Antibiot.* 31:1655–1663.

- Deng CC, Liang Y, Wu MS, Feng FT, Hu WR, Chen LZ, Feng QS, Bei JX, Zeng YX. 2013. Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Biochem Cell B.* 45:1997–2006.
- Dréan A, Goldwirt L, Verreault M, Canney M, Schmitt C, Guehennec J, Delattre JY, Carpentier A, Idbaih A. 2016. Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma. *Expert Rev Neurother (formerly Future Drugs).* 16:1285–1300.
- Dutton CJ, Banks BJ, Cooper CB. 1995. Polyethers ionophores. *Nat Prod Rep.* 12:165–181.
- Gachon P, Kergomard A. 1975. Grisorixin, an ionophorous antibiotic of the nigericin group. II Chemical and structural study of grisorixin and some derivatives. *J Antibiot.* 23:351–357.
- Gachon P, Kergomard A, Veschambre H, Esteve C, Staron C. 1970. Grisorixin, a new antibiotic related to nigericin. *Chem Commun.* 21:1421–1422.
- Hamdali H, Virolle MJ, von Jan M, Sproer C, Klenk HP, Ouhdouch Y. 2011. *Streptomyces youssoufiensis* sp. nov., isolated from a Moroccan phosphate mine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61:1104–1108.
- Hegazy AM, Yamada D, Kobayashi M, Kohno S, Ueno M, Ali MAE, Ohta K, Tadokoro Y, Ino Y, Todo T, et al. 2016. Therapeutic strategy for targeting aggressive malignant gliomas by disrupting their energy balance. *J Biol Chem.* 291:21496–21509.
- Huczynski A. 2012. Polyether ionophores – promising bioactive molecules for cancer therapy. *Bioorg Med Chem Lett.* 22:7002–7010.
- Mohammadipanah F, Wink J. 2016. Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Front Microbiol.* 6:1541.
- Mohammadipanah F, Hamed J, Sproer C, Rohde M, Montero-Calasanz MC, Klenk HP. 2014. *Streptomyces zagrosensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64:3434–3440.
- Mousslim J, Cuer A, David L, Tabet JC. 1993. Epigrisorixin, a new polyether carboxylic antibiotic. *J Antibiot.* 46:201–203.
- Oikawa H, Aihara Y, Ichihara A, Sakamura S. 1992. Accumulation of grisorixin caused by treating a nigericin-producing strain with a P-450 inhibitor. *Biosci Biotech Biochem.* 56:684–684.
- Rutkowski J, Brzezinski B. 2013. Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics. *Bio Med Res Int.* Article ID 162513.
- Smith L, Hong H, Spencer JB, Leadaly PF. 2008. Analysis of specific mutants in the lasalocid gene cluster: evidence for enzymatic catalysis of a disfavoured polyether ring closure. *Chem Bio Chem.* 9:2967–2975.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New Engl J Med.* 352:987–996.
- Sun Y, Zhou X, Dong H, Tu G, Wang M, Wang B, Deng Z. 2003. A complete gene cluster from *Streptomyces nanchangensis* NS3226 encoding biosynthesis of the polyether ionophore nanchangmycin. *Chem Biol.* 10:431–441.
- Taechowisan T, Chanaphat S, Ruensamran W, Phutdhawong WS. 2013. Antibacterial activity of 1-methyl ester nigericin from *Streptomyces hygrosopicus* BR10: an endophyte in *Alpinia galanga*. *J Appl Pharm Sci.* 3:104–109.
- Wang C, Wang L, Fan J, Sun K, Zhu W. 2017. Cytotoxic compounds from the deep-sea sediment-derived *Streptomyces malaysiensis* OUCMDZ-2167. *Chinese J Org Chem.* 37:658–666.
- Yakisich JS, Azad N, Kaushik V, O'Doherty GA, Iyer AKV. 2017. Nigericin decreases viability of multidrug-resistant cancer cells and lung tumorspheres and potentiates the effects of cardiac glycosides. *Tumor Biol.* 39:1010428317694310.
- Zhou HM, Dong TT, Feng LL, Feng B, Zhao HC, Fan XK, Zheng MH. 2012. Suppression of colorectal cancer metastasis by nigericin through inhibition of epithelial-mesenchymal transition. *World J Gastroenterol.* 18:2640–2648.
- Zhou W, Cheng L, Shi Y, Ke SQ, Huang Z, Fang X, Chu C, Xie O, Bian X, Rich JN, et al. 2015. Arsenic trioxide disrupts glioma stem cells via promoting PML degradation to inhibit tumor growth. *Oncotarget.* 6:37300–37315.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Nigericin and grisorixin methyl ester from the Algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain: a computational study on their epimeric structures and evaluation of glioblastoma stem cells growth inhibition

Nassima Leulmi^{a,b,c}, Denise Sighel^{a,d}, Andrea Defant^a, Karima Khenaka^b, Abderrahmane Boulahrouf^b, Ines Mancini^{a,*}

^a *Bioorganic Chemistry Laboratory, Department of Physics, University of Trento, Trento, Italy.*

^b *Microbiological Laboratory Engineering and Application, Department of Microbiology, Mentouri Brothers University, Constantine, Algeria.* ^c *Department of Cellular and Molecular Biology, University Abbes Laghrour Khenchela, Khenchela, Algeria.* ^d *Centre for Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Trento, Italy*

*Corresponding author e-mail: ines.mancini@unitn.it

Abstract

The present work describes the metabolites produced by a strain identified as *Streptomyces youssoufiensis*, whose secondary metabolites profile has not been studied so far. The crude ethyl acetate extract was analyzed by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS), leading to the detection of the ionophoric polyethers nigericin, epinigericin, abierixin and the newly isolated grisorixin methyl ester. The presence of epimeric forms of nigericin/epinigericin and grisorixin/epigrisorixin has spurred DFT computational calculations. This analysis was able to provide the relative stability of the most favored epimers, setting the basis for general structural considerations applicable to several other polyethers. Both nigericin sodium salt and grisorixin methyl ester showed to affect glioblastoma stem cells proliferation in a dose-dependent manner, with a higher activity for the more lipophilic grisorixin methyl ester (GI₅₀ values of 3.85 and 3.05 μ M for VIPI and COMI human glioblastoma stem cells, respectively).

Keywords: Streptomyces, HPLC-ESI/MS, Polyethers, DFT calculation, Cytotoxicity, Glioblastoma.

Contents

Experimental

1. Isolation and identification of the bacterial strain
2. Crude extract and metabolite profile by LC-ESI MS analysis
3. General procedures for isolation and structural elucidation
4. Isolation and structural elucidation of the metabolites
5. Computational details on the study of epimerization
6. Cytotoxicity evaluation
7. References

Figure S1. Spore chain morphology of SF10 *Streptomyces* observed by scanning electron microscopy (SEM) analysis.

Table S1. Morphological and physiological characteristics of *Streptomyces* sp. SF10.

Figure S2. LC-MS analysis (RP18, MeOH/H₂O + 0.1% TFA gradient elution) of the ethyl acetate extract from SF10 strain. (a) Extracted-ion chromatogram. (b) The peak at 11.3 min associated to nigericin by comparison with a standard sample. (c) MS signals of [M+Na]⁺ ions corresponding to the indicated retention times.

Scheme S1. Chromatographic purification of polyether metabolites present in the extract of SF10 strain: abierixin, nigericin, epinigericin and grisorixin methyl ester. FC = flash chromatography; RP = reversed phase; PLC = preparative TLC; DCM = dichloromethane.

Table S2. Energy values obtained by DFT calculation at a B3LYP/6-31G(d,p) level of theory for simplified structures taken as model for the F-ring of the indicated polyether metabolite. The C-numbering resumes that reported for polyethers in Figure 1.

Experimental

1. Isolation and identification of the bacterial strain

A semi-arid soil sample (10 g) collected at Chélia Mountain (35°19'6"N, 6°38'15"E), in Khenchela (North-eastern Algeria), was diluted in 100 mL of sterile distilled water. The mixture was allowed to settle, and then serial ten-fold dilutions were prepared. An aliquot (0.1 mL) was taken from each dilution and spread evenly over the surface of Olson medium containing polymixin and nystatin (each at a 0.050 mg/mL concentration). Plates were incubated at 30°C for 14 days. Actinobacteria colonies were picked and purified by serial subcultures on yeast malt extract agar (YMEA) medium. Among the eleven actinomycetes strains isolated, SF10 strain (where the acronym SF indicates Soil Forest because Chélia Mountain is rich in forest), was selected based on its ability to inhibit the growth of pathogenic and phytopathogenic bacteria (MRSA and *Bacillus subtilis*) and fungi (*Fusariumoxysporum*). Methods and media described by the International Streptomyces Project (ISP) as well as light microscopy and scanning electron microscopy (SEM-FEG Jeol JSM-7001F) were used to assess the strain morphology. After a preliminary identification, the genomic DNA was isolated from SF10 strain according to a reported method (Pospiech and Neuman 1995). The 16S rRNA genes from pure culture was amplified using the universal primers F27 [5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'] and R1492 [5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3'] (Heueret al. 1997; Monciardini et al. 2002). Sequences were assembled using Sequencher software (version 4.7) and analyzed by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) on NCBI. Sequence of SF10 strain was deposited in the GenBank under accession number KU 373054.

2. Crude extract and metabolite profile by LC-ESI MS analysis

Pure culture of SF10 strain was used to inoculate plates of Bennett's agar medium. After 14 days incubation at 30°C, the mycelial mass together with the culture medium was cut into small pieces, subjected to sonication and macerated overnight in ethyl acetate (x2). The combined filtrates were evaporated *in vacuo* to give a yellow crude extract (1.0 g). For HPLC-ESIMS analysis, the crude extract was dissolved in methanol (1mg/mL), loaded on an Eclipse reversed-phase column (HP, Hypersil BDS-C18, 4.6x150mm, 3.5µm) and analyzed by a Hewlett-Packard HP1100 HPLC-UV Diode Array detector (DAD), coupled online to an Esquire-Bruker-Daltonics ion trap mass spectrometer. The mobile phase used was: A (MeOH: H₂O, 9:1,+ 0,1%

TFA) for 25min and B (MeOH 100%, + 0,1% TFA) from 25min to 50min, flow 1mL/min. The measurements were performed in positive and negative ion detection mode with a scan range between m/z 200–900.

3. General procedures for isolation and structural elucidation

Solvents were purchased from Sigma Aldrich Europe or Alfa Aesar and were used without any further purification. All evaporations were carried out at reduced pressure. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck Kieselgel Si60 PF254 and the spots visualized at 254 nm or by carbonization after treatment with an acidic solution of cerium (IV) sulfate. Preparative TLC was performed using 20 cm×20 cm Merck Kieselgel 60 F254, 0.5 mm plates. Reversed phase RP-FC was carried out on a Merck Lichroprep RP-18 column. RP-HPLC was carried out using Luna C18, 5 μ m, 250X460 nm, or Eclipse C18, 3.5 μ m columns and 1mL/min flow. Polarimetric data were obtained with a Bellingham & Stanley Limited ADP 440 apparatus, reporting $[\alpha]_D$ in $\text{dm}^{-1}\text{deg mL g}^{-1}$. Infrared (IR) spectra were recorded by a FT-IR Tensor 27 Bruker spectrometer with Attenuated Transmitter Reflection (ATR) configuration, with 1 cm^{-1} resolution. NMR spectra were recorded by an Avance 400 Bruker spectrometer by using a 5 mm BBI probe; ^1H NMR spectra at 400 MHz and ^{13}C at 100 MHz, in CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.25$ ppm and $\delta_{\text{C}} = 77.0$ ppm). Structural assignments are by Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) experiments. ESI-MS data and tandem fragmentation (MS/MS) spectra were recorded using a Bruker Esquire LC ion trap mass spectrometer, equipped with an electrospray ion (ESI) source in positive or negative ion mode, by injection of a methanol solution of the sample into the source. MS conditions: source temp. 300°C, nebulizing gas N_2 , 4 l min^{-1} , cone voltage 32 V, scan range m/z 100–900. Fragmentation experiments were carried out using helium to collisionally activate the selected primary ions. High-resolution ESI MS measurements for grisorixin methyl ester were obtained by direct infusion using an Orbitrap Fusion Tribrid[®] mass spectrometer.

4. Isolation and structural elucidation of the metabolites

The EtOAc crude extract (0.8 g) was subjected to FC on a column of silica gel, 15–25 μm (Merck), using dichloromethane/MeOH at gradient elution. Eluted fractions were collected sequentially, concentrated *in vacuo* and combined after TLC analysis. In detail, fractions 28-34,

eluted with dichloromethane/MeOH 8:2, were combined (0.10 g) and further purified on Merck Lichroprep RP-18 column, using a gradient of MeOH/H₂O, to give fr. 10 (10 mg), fr. 17-18 (36 mg) and fr. 20-23 (19 mg). Fr. 10 was subsequently purified by RP HPLC (MeOH/H₂O + 0.1% TFA 6:4) to provide abierixin ($t_R=5.5$ min, 1.2 mg). Fr. 17-18 were subjected to PLC (hexane/isopropanol 9:1), which allowed to recover nigericin (18.0 mg) and epinigericin (6.5 mg). Fr. 20-23 were subjected to RP HPLC (MeOH/H₂O + 0.1% TFA, 9:1 from 0 to 25 min, then MeOH + 0.1% TFA) to obtain grisorixin methyl ester ($t_R= 35.3$ min, 10 mg). An overview of the purification workup is reported in Supporting, Scheme S1.

Data of abierixin (1)

White solid; $[\alpha]_D = 39.3^\circ$ (c=0.001, MeOH), lit. (David et al. 1985) $+45^\circ$ (c=0.03, MeOH); IR: 3407, 2927, 1692, 1649, 1458, 1378, 1052 and 956 cm⁻¹. ¹H NMR and ¹³C NMR (CDCl₃) spectra resulted in agreement with the reported data (Siwen et al. 2011). ESIMS(+): m/z 747.5 [M+Na]⁺; ESI(+)/MS/MS (747.5) m/z 729.4; ESIMS³(+) 729: m/z 685.3. ESIMS(-): m/z 723.5 [M-H]⁻; ESIMS/MS(-) (723.5): m/z 679.3, 439.3.

Data of nigericin (2)

White solid. IR: 3446, 2930, 1715, 1266, 1127 cm⁻¹. ¹H NMR and ¹³C NMR (CDCl₃) spectra showed signals superimposable to the reported data (Gong et al. 2010). ESIMS(+): m/z 747.5 [M+Na]⁺; ESI(+)/MS/MS (747.5) m/z 729.4; ESIMS³(+) 729: m/z 685.3. ESIMS (-): m/z 723.5 [M-H]⁻; ESIMS/MS(-) (723.5): m/z 679.3 439.3.

Data of epinigericin (3)

White solid. IR: 3200, 2900, 1580, 1380, 1120, 1040, 950, 650 cm⁻¹. NMR data are in agreement with the reported ones (Berrada et al. 1987). ESIMS(+): m/z 747.5 [M+Na]⁺; ESIMS/MS(+) (747.5) m/z 729.4; ESIMS³(+)729: m/z 685.3. ESIMS(-): m/z 723.5 [M-H]⁻; ESIMS/MS(-) (723.5): m/z 679.3, 439.3.

Data of grisorixin methyl ester (4)

White solid; $[\alpha]_D = +9.1$ (c=0.004 g/mL, MeOH); FT-IR: ν 3432 (vs), 2928 (vs), 1739 (s), 1459 (s), 1377 (m), 1220 (w), 1113 (s), 1061 (vs), 961 (s) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ = 4.19 (2H, m), 4.12 (2H, m), 3.87 (1H, brd, $J=8.6$ Hz), 3.72 (3H, s), 3.68 (1H, m), 3.58 (1 H, brd, $J=9.8$ Hz), 3.38 (3H, s), 3.36(1H, m), 2.50 (1H, m), 2.47 (1H, m), 2.10-1.42 (20H, series of m), 1.16 (3H, s), 1.02 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 0.99-0.93 (series of d, 18H, $J=6.9$ Hz), 0.92 (3H, d, $J= 8.0$

Hz), 0.86 (3H, brd, $J=6.9$ Hz), 0.84 (3H, d, $J=6.7$ Hz); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta=$ 176.4, 107.6, 98.3, 86.3, 84.3, 81.7, 79.6, 78.8, 73.7, 69.4, 60.3, 58.8, 51.7, 45.7, 43.1, 40.3, 39.5, 37.2, 36.8, 35.6, 35.3, 34.3, 33.6, 32.6, 31.9, 29.6, 29.2, 27.6, 27.2, 25.9, 25.8, 24.0, 22.7, 17.7, 16.3, 16.1, 14.1, 13.0, 12.5, 11.6; Significant HSQC correlations: 3.38 ppm (s, MeO-C16) with 58.8; 3.72 ppm (s, COOMe) with 51.7 ppm and HMBC correlations: 3.38 ppm (s, MeOC-16) with 79.6 ppm (C-11), 3.72 ppm (s, COOMe) with 176.4 ppm (COO); ESI(+)MS: m/z 745.48526 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ESI(+)MS/MS (745): m/z 713.46007 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}+\text{Na}]^+$, HRESI(+)MS: m/z 745.48526 \pm 0.00500 (calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{NaO}_{10}$, 745.486120); ESI(-)MS: m/z 721.48169 $[\text{M}-\text{H}]^-$, HRESI(-)MS: m/z 721.48169 \pm 0.00500 (calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{69}\text{O}_{10}$, 721.489622).

5. Computational details on the study of epimerization

Starting structures were generated by molecular mechanics minimization, using PC Model (Serena Software, version 7.00). Quantum chemical calculations were performed on a Pentium IV/3.6 GHz personal computer using the Gaussian 03W revision E.01 package program set (Frisch et al. 2004). Restricted density functional theory (DFT) was used for geometry optimization invoking gradient geometry optimization. The basis set of choice was 6-31 G (d,p) for all the atoms. The gradient-corrected DFT with the three-parameter hybrid functional (B3) (Becke 1993) for the exchange part and the Lee–Yang–Parr (LYP) correlation function (Lee et al. 1988) were utilized. The simulations in the presence of water were achieved using the polarizable continuum model (PCM). The optimized structural parameters were employed in the vibrational energy calculations at the DFT levels to characterize all stationary points as minima. For each optimized structure, no imaginary wave number modes were obtained, proving that a local minimum on the potential energy surface was actually found.

6. Cytotoxicity evaluation

Human glioblastoma stem cells (COMI and VIPI) were cultured in DMEMF12 and Neurobasal media (ratio 1:1, pH 7.4), supplemented with B27 (100X), 2 mmol/L Glutamax, 100 U/mL penicillin G, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL FGF2 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin. GSCs were grown in adherence on laminin in a 5% CO_2 environment at 37°C.

In the *in vitro* assay 4000 cells/well for COMI and 3500 cells/well for VIPI were seeded in 96-well plate on laminin in adherence and incubated at 37 °C, 5% CO_2 , for 24 h. The cells were then

treated with nigericin sodium salt or grisorixin methyl ester at desired concentrations. Following drug addition, the plates were incubated for 48 h at 37 °C, 5% CO₂. Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) and propidium iodide (PI, Sigma Aldrich) were then added to a final concentration of 1µg/mL and incubated for 20 min at room temperature in the darkness. The plates were read using Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer). All the experiments were performed in technical quadruplicates and in biological triplicates. The number of live cells for each treatment was estimated by subtracting PI positive cells from the total number of cells counted using Hoechst. The percentage of viable cells was calculated as normalized to control treatment (100% viability). Dose-response curves were plotted and growth inhibition 50 (GI₅₀) values calculated for nigericin sodium salt and grisorixin methyl ester. The final GI₅₀ value for each drug was calculated as mean of the three biological replicates (standard deviation reported).

7. References

- Becke A D. 1993. Density-functional thermochemistry III. The role of exact exchange. *J Chem Phys.* 98:5648–5652
- Berrada R, Dauphin G, David L. 1987. Epinigericin, a new polyether carboxylic antibiotic. Structural determination by 2D NMR methods. *J Org Chem.* 52: 2391-2396
- David L, Leal Ayala H, Tabet JC. 1985. Abierixin, a new polyether antibiotic. Production, structural determination and biological activities. *J Antibiot.* 31:1655–1663
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA, Vreven JrT, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Adam, C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA. 2004. Gaussian Revision E.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT.
- Gong Y, Chen J, Yang T, Li Z, Li G. 2010. Secondary metabolites with anti-*Staphylococcus aureus* activity from *Streptomyces hygroscopicus*. *Chin J Appl Environ Biol.* 16: 261-263.
- Heuer H, Kserk M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH. 1997. Analysis of Actinomycetes communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol.* 63:3233–3241
- Lee C, Yang W, Parr RG. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B.* 37:785–789.
- Monciardini P, Sosio M, Cavaletti L, Chiocchini C, Donadio S. 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16S DNA from different groups of Actinomycetes. *FEMS Microbiol Ecol.* 42:419–429
- Pospiech A, Neuman B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11:217–218

Siwen N, Sumei L, Xinpeng T, Tao H, Jianhua J, Xiaohong Y, Si Z, Changsheng Z. 2011. Isolation and structural elucidation of secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. SCSIO 1934. Chin J Chin Mat Med. 36: 1768-1766.

Figure S1. Spore chain morphology of SF10 *Streptomyces* observed by scanning electron microscopy (SEM) analysis.

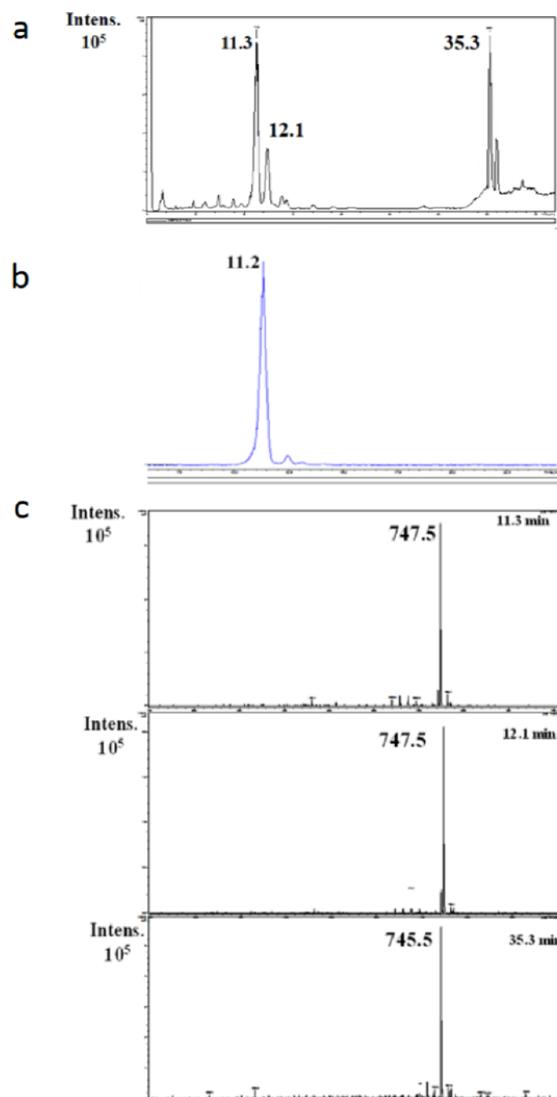


Table S1. Morphological and physiological characteristics of *Streptomyces* sp. SF10

Morphological characteristics		Degradation activities	
Color of spore mass	Yellow	Starch	-
Carbon source utilization		Casein	-
D-glucose	+++	Gelatin	++
Lactose	+	Adenine	-
Cellulose	-	Tween	-
Arabinose	+	Tyrosine	-
D-xylose	+	Pectin	-
Saccharose	-	Cellulose	-
D-fructose	++	Growth in the presence of inhibitory compounds	
D-maltose	++	NaCl 4%	+++
D-galactose	+	7%	±
D-ribose	+++	10%	-
Sorbitol	-	13%	-
Inositol	±	phenol	-
Mannitol	+++	Crytal violet	-
Nitrogen utilization		Sensibility to antibiotics^{a)}	
		(µg/mL)	mm
Asparagine	+	Amikamycin (30)	22
Methionine	-	Spiramycin (100)	0
Aspartic acid	+++	Erythromycin (15)	0
Cysteine	-	Emipeneme (10)	24
Tyrosine	+++	Nalidixique acid (30)	0
Arginine	-	Cefuroxime (30)	0
Proline	++	Streptomycin (10)	0
Glycine	+		
Tryptophan	-		

a) Diameter of inhibition (mm) at the concentration indicated in brackets

Figure S2. LC-MS analysis (RP18, MeOH/H₂O + 0.1% TFA gradient elution) of the ethyl acetate extract from SF10 strain. (a) Extracted-ion chromatogram. (b) The peak at 11.3 min associated to nigericin by comparison with a standard sample. (c) MS signals of [M+Na]⁺ ions corresponding to the indicated retention times.



Scheme S1. Chromatographic purification of polyethermetabolites present in the extract of SF10 strain: abierixin, nigericin, epinigericin and grisorixinmethyl ester. FC = flash chromatography; RP = reversed phase; PLC = preparative TLC; DCM = dichloromethane.

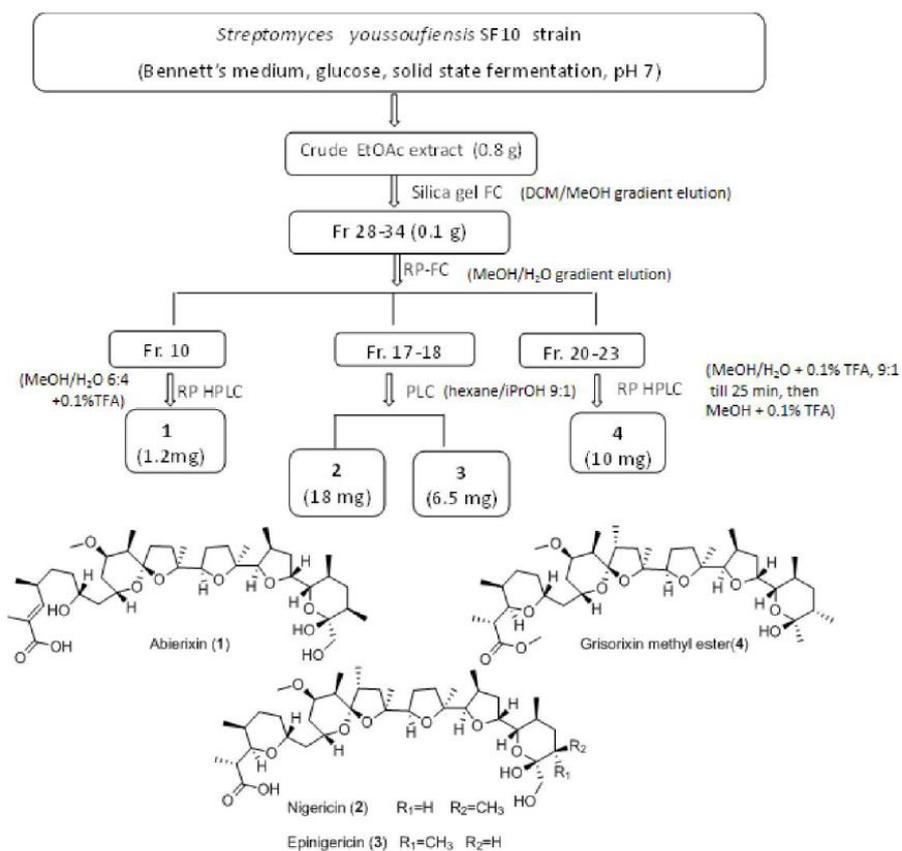
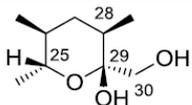
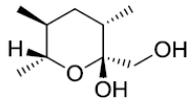
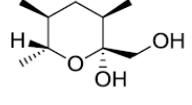
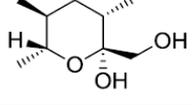
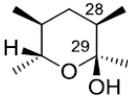
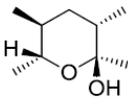
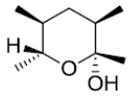
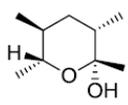


Table S2. Energy values obtained by DFT calculation at a B3LYP/6-31G(d,p) level of theory for simplified structures taken as model for the F-ring of the indicated polyether metabolite. The C-numbering resumes that reported for polyethers in Figure 1.

Nigericin-like metabolite	Structural Moiety	<i>In vacuo</i>		In H ₂ O	
		Energy (a.u.)	ΔE related to nigericin (kJmol ⁻¹)	Energy (a.u.)	ΔE related to nigericin (kJmol ⁻¹)
Nigericin (2)		-579.49456813	-	-579.50211165	-
Epinigericin (3)		-579.49472552	-0.4129	-579.50310163	-2.5992
C-29 epimer of nigericin		-579.49332270	+ 3.2719	-579.50051262	+4.1983
C-29 epimer of epinigericin		-579.49247169	+5.4877	-579.49975007	+6.2003
Grisorixin-like metabolite	Structural Moiety	Energy (a.u.)	ΔE related to grisorixin (kJmol ⁻¹)	Energy (a.u.)	ΔE related to grisorixin (kJmol ⁻¹)
Grisorixin		-504.28877454	-	-504.29328817	-
Epigrisorixin		-504.28631943	+9.9357	-504.29093337	+6.1825
C-29 epimer of grisorixin		-504.28317969	+14.6900	-504.28881966	+11.7321
C-29 epimer of epigrisorixin		-504.28136691	+19.4472	-504.28673415	+4.1127

Identification polyphasique des souches d'actinobactéries isolées d'échantillons de sols semi-arides. Caractérisation structurale des antibiotiques produits

Résumé

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses, habitant principalement le sol. Elles sont connues par la production d'une grande diversité de molécules bioactives, notamment les antibiotiques. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail de recherche. Pour cela, 99 isolats d'actinobactéries, ont été obtenus à partir d'échantillons de sols, semi-arides algériens, peu exploités ; sol rhizosphérique (Pin d'alep Wilaya de khenchela), sol montagneux (Djebel Chélia, Wilaya de Khenchela) et sol de Sebkha (Wilaya d'Oum Elbouaghi). Le criblage préliminaire basé sur l'activité antimicrobienne, a permis la sélection de trois isolats très performants ; SF10, SFKH4 et SFKH10. L'étude phénotypique et chimiotaxonomique, des trois isolats, a permis de les affilier au genre *Streptomyces*. L'analyse phylogénétique a permis d'attribuer les isolats SF10, SFKH4 et SFKH10, respectivement, aux espèces *Streptomyces youssoufiensis*, *Streptomyces spororaveus* et *Streptomyces coeruleorubidus* avec des pourcentages de similarité de 99,8%, 99% et 99%, respectivement.

L'activité antimicrobienne a été réalisée contre plusieurs microorganismes-tests, en utilisant les extraits de molécules produites par les trois souches après culture en milieux solides et extraction par l'acétate d'éthyle. La structure des molécules actives, purifiées par différentes méthodes chromatographiques, a été réalisée en couplant plusieurs techniques de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN ¹H, RMN ¹³C, MS, MS tandem, IR et UV-Visible). La souche *S. youssoufiensis* SF10, a produit plusieurs molécules appartenant à la famille des polyéthers ionophores ; aberixine, nigéricine, épiginigéricine et la nouvelle molécule grisorixine méthyl ester. Par ailleurs, une seule molécule, appartenant à la famille des macrotetrolides (la dinactine), a été obtenue de la souche *S. coeruleorubidus* SFKH10. De plus, l'étude préliminaire des molécules sécrétées par la souche *Streptomyces spororaveus* SFKH4 a montré sa richesse en composés très complexes de haut poids moléculaire.

Afin d'obtenir la stabilité relative des épimères (nigéricin/epiginigéricin et grisorixin/epigrisorixin), des calculs de DFT (*Density Functional Theory*) ont été effectués. Les résultats sont d'un intérêt général car elles peuvent être appliquées à une large gamme de polyéthers naturels polycycliques

D'autre part, l'étude de la cytotoxicité des molécules purifiées et identifiées a révélé que la nigéricine et la grisorixine méthyl ester ont affecté négativement la prolifération des cellules souches du glioblastome humain de manière dose-dépendante, avec une activité plus élevée pour la grisorixine méthyl ester dont les valeurs CI50 de 3,85 et 3,05 µM pour les cellules souches du glioblastome VIPI et COMI, respectivement.

En conclusion, la présente étude a permis de révéler le potentiel des écosystèmes semi-arides algériens comme étant des réservoirs importants de souches d'actinobactéries productrices de molécules bioactives, notamment la souche *S. youssoufiensis* SF10 dont les métabolites ont été caractérisés pour la première fois, par la méthode de bioguidé. La fore cytotoxicité de la nouvelle molécule grisorixine méthyle ester représente un point de départ pour le développement de nouveau traitement contre le glioblastome multiforme.

Mots clés : Actinobactéries, *Streptomyces*, sols semi-arides, antibiotiques, polyéthers ionophores, cytotoxicité.