

ACTIVITE ANTILEVURIENNE D'UNE SOUCHE D'ACTINOBACTERIE APPARTENANT AU GENRE *STREPTOSPORANGIUM* ET ISOLEE D'UN SOL SAHARIEN

BOUDJELLA Hadjira^{*}, LAMARI Lynda, BOUTI Karima et SABAOU Nasserline
Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM)
Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie. E-mail: h-boudjella@live.fr

Résumé.- Une nouvelle souche d'actinobactérie isolée d'un sol saharien, appartenant au genre *Streptosporangium* et désignée Sg163 présente une activité antilevurienne dirigée principalement contre *Candida albicans*. Cette activité est évaluée dans différents milieux de culture. Les composés bioactifs sont ensuite extraits et purifiés par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex LH-20 et par HPLC, puis caractérisés partiellement par des révélations chimiques et par des analyses spectroscopiques. Les résultats indiquent que la souche de *Streptosporangium* Sg163 produit trois complexes antibiotiques rattachés au groupe des aminoglycosides.

Mots clés: Actinobactérie, *Streptosporangium*, activité antilevurienne, production, caractérisation d'antifongiques.

ANTIYEAST ACTIVITY FROM AN ACTINOBACTERIAL STRAIN OF THE GENUS *STREPTOSPORANGIUM* ISOLATED FROM A SAHARAN SOIL

Abstract.- A new strain of actinobacteria isolated from a Saharan soil, belonging to the genus *Streptosporangium* and designated Sg163 produced an antiyeast activity directed mainly against *Candida albicans*. The production of the antiyeast activity was evaluated in different culture media. The bioactive compounds were then extracted and purified by column chromatography on LH-20 Sephadex gel and by HPLC, and partially characterized by chemical revelations and spectroscopic analyzes. The results indicate that the strain of *Streptosporangium* Sg163 produces three antibiotic complexes related to the aminoglycosides group.

Key words: Actinobacteria, *Streptosporangium*, antiyeast activity, production, characterization of antifungals.

Introduction

La recherche de nouveaux agents antifongiques ne cesse de se développer. Elle est stimulée principalement par l'acquisition de la résistance des microorganismes pathogènes aux agents antifongiques utilisés, comme les dérivés azolés, la 5-fluorocytosine et l'Amphotéricine B [1,2,3]. Elle est également justifiée par l'émergence massive des infections fongiques associées aux maladies (SIDA, cancer, diabète, transplantation d'organes, etc.) et la hausse de la fréquence des mycoses mortelles dues à l'emploi de protocoles thérapeutiques immunosuppresseurs [4,5]. Dans ce cas, les champignons peuvent se révéler opportunistes et causer divers types de mycoses, allant des formes localisées superficielles aux atteintes profondes invasives mettant en jeu le pronostic vital [6]. Parmi les infections fongiques impliquées en pathologie humaine, l'agent étiologique le plus courant est la levure *Candida albicans*. Les candidoses sont les infections opportunistes les plus fréquentes [7,8] et la quatrième cause d'infection nosocomiale [9].

En conséquence, le contrôle de la colonisation fongique par l'utilisation de nouveaux antifongiques peut s'avérer une piste incontournable.

Dans un tel contexte, et pour être en mesure de réduire l'incidence et les conséquences des candidoses, il est nécessaire de rechercher de nouvelles molécules antifongiques innovantes. Les antibiotiques en général, sont élaborés par divers organismes vivants notamment les microorganismes (bactéries et champignons). Parmi ceux-ci, les actinobactéries, appelés aussi actinomycètes, constituent l'un des groupes les plus étudiés pour le dépistage de nouvelles molécules bioactives [10,11]. Ces bactéries sont retrouvées dans divers habitats, même les plus hostiles, et principalement dans les sols. Le genre *Streptomyces* est le principal pourvoyeur en antibiotiques, mais d'autres genres sont également producteurs. L'une des stratégies pour augmenter la probabilité d'obtenir de nouveaux antibiotiques d'origine actinobactérienne est d'explorer des environnements extrêmes (sols arides, salés, etc.) et des habitats les moins exploités et également viser des actinobactéries dites 'rares' [12,13]. Ainsi, Les bioprospections de tels environnements ont été d'un succès remarquable. En effet, plusieurs actinobactéries rares ont été isolées et sont à l'origine de nouveaux antibiotiques [14,15,10,13,11].

Les sols sahariens d'Algérie représentent des écosystèmes particuliers. Leur exploration a permis de mettre en évidence leur richesse et leur biodiversité en actinobactéries rares [16]. De nombreux travaux ont été réalisés dans le but de rechercher des souches productrices d'antibiotiques. Plusieurs souches isolées sont de nouvelles espèces et produisent de nouvelles molécules antimicrobiennes [17-22].

A ce propos, une souche d'actinobactérie rare identifiée au genre *Streptosporangium* et isolée d'un échantillon de sol saharien, a présenté une activité antifongique à action dirigée essentiellement contre la levure *Candida albicans*. Dans ce travail, la production des antibiotiques antilevuriens, leur extraction, leur purification et leur caractérisation sont rapportées.

1.- Matériel et méthodes

1.1.- Origine de la souche

La souche Sg163 de *Streptosporangium* sp. a été isolée par la méthode des suspensions-dilutions [23] à partir d'un échantillon de sol de la palmeraie d'Adrar (Sahara central algérien), prétraité à 120°C pendant 1 h [24] et sur milieu «chitine-vitamines-agar» [25] additionné de cycloheximide (50 µg/ml).

1.2.- Détermination des propriétés antilevuriennes de la souche

La souche Sg163 a été évaluée pour ses propriétés antilevuriennes par la méthode des stries croisées [26] sur milieu ISP2 solide contre les souches de levures suivantes: *Candida albicans* IPA 200, *Candida albicans* IPA 224, *Kluyveromyces lactis* K231, *Rhodotorula mucilaginosa* R254 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226.

Cette méthode consiste à ensemercer la souche Sg163 en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri (diamètre = 9 cm). Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les souches de levures sont ensemençées perpendiculairement à l'actinobactérie. Chaque souche-cible est ensemençée 3 fois. La lecture des résultats se fait

en mesurant, après 24 h d'incubation, la distance d'inhibition entre les bordures de la souche-cible et de la souche Sg163.

1.3.- Cinétiques de production d'antibiotiques en milieux de culture agités

1.3.1.- Recherche d'un milieu de culture de production optimale

Afin de déterminer le milieu de culture de production optimale, cinq milieux de complexes préconisés pour la production d'antibiotiques sont testés. Les milieux sélectionnés sont: le milieu ISP2 [27] à base de glucose, d'extrait de levure et d'extrait de malt; le milieu Bennett [28] à base de glucose, d'extrait de viande, d'extrait de levure et de peptone; le milieu ISP4 [27] à base d'amidon et de sels inorganiques; le milieu désigné M4 [29] à base de glycérol, d'extrait de levure, d'extrait de malt et de peptone of soja, et le milieu M5 [30] à base de glucose, d'extrait de viande, de levure sèche et de peptone. Chaque expérience est réalisée en triple.

Les milieux sont préparés dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu. Le pH est ajusté à 7,3 avant autoclavage. Pour les précultures, la souche Sg163 est cultivée sur le milieu ISP2 solide pendant 7 jours à 30°C. Le mycélium est ensuite raclé à l'aide d'une anse et inoculé dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de chaque milieu testé. Après 4 jours d'incubation dans un agitateur rotatif (250 rpm) à 30°C, des aliquotes (5%, v/v) de la préculture sont transférés dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu. Ces cultures de production sont incubées en agitation rotative (250 rpm) à 30°C. Les cinétiques sont suivies pendant 13 jours. La production des antibiotiques antilevuriens est mesurée par la méthode de diffusion des puits [31] contre *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226. Vingt millilitres (20 ml) de milieu Sabouraud (à 12 g/l d'agar) sont inoculés avec 100 µl de suspension levurienne contenant 10⁸ UFC/ml, puis coulés en boîtes de Pétri et laissés se solidifier à la température de laboratoire. Des puits de 10 mm sont confectionnés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce. Chaque puits reçoit 200 µl de filtrat de culture. Les prélèvements sont effectués toutes les 24 h pendant 13 jours. Les boîtes sont mises 2 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits après 24 h d'incubation.

1.3.2.- Cinétique de production en milieu ISP2

Les précultures, les cultures, les prélèvements et la mesure de la production sont effectués dans les mêmes conditions que l'expérience précédente. Au cours de cette cinétique, la croissance et le pH sont également mesurés.

La croissance est calculée par la mesure du poids sec de la biomasse selon la méthode de PFEFFERLE *et al.* (1997) [32]. Chaque jour une aliquote de 2 ml de la culture homogénéisée est prélevée stérilement dans un tube Eppendorf de 2 ml préalablement taré. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min, le surnageant est récupéré séparément pour mesurer le pH (pH mètre HANNA instruments). L'Eppendorf contenant le culot servira pour la mesure de la croissance. Il est déposé dans un four à 105°C pendant 24 h. Le poids sec obtenu est rapporté en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture.

1.4.- Extraction et purification des composés antilevuriens

Une fois le jour de production optimale déterminé lors de la cinétique en milieu de culture ISP2, des cultures de production sont réalisées. Le jour de production optimale, la culture est arrêtée pour faire l'extraction puis la purification des composés antilevuriens.

1.4.1.- Extraction de l'activité antilevurienne

L'extraction des antibiotiques est réalisée à partir du filtrat de culture en ampoules à décanter et en utilisant le *n*-butanol. Ce solvant a été choisi parmi 4 solvants dans un test préliminaire. La culture est centrifugée puis filtrée. Le filtrat est mélangé dans une ampoule à décanter, avec un volume égal en solvant. Les phases organique et aqueuse sont récupérées séparément et testés pour leur activité antilevurienne.

1.4.2.- Traitement de la phase aqueuse au charbon actif

L'activité antilevurienne n'étant pas extractible par le *n*-butanol, elle reste dans la phase aqueuse. Sa purification s'est avérée difficile à cause des pigments bruns issus du filtrat de culture. Un traitement au charbon actif permet d'adsorber les pigments et les éliminer de la phase aqueuse. Pour cela, la phase aqueuse est additionnée de charbon à raison de 20 g/l. Le tout est mis en agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante, puis centrifugé. Le surnageant est filtré sous vide avec des filtres membranes de 0,45 µm. La phase aqueuse, initialement brune foncée, devient alors nettement plus claire. Cette phase aqueuse décolorée est concentrée à sec au rotavapeur, puis récupérée dans un minimum d'eau bi-distillée.

1.4.3.- Semi-purification des antibiotiques par chromatographie sur colonne

Du gel de Séphadex LH-20 (Fluka) est utilisé comme phase stationnaire pour la purification des substances antilevuriennes. Ce gel a été préalablement gonflé et coulé dans une colonne en verre (dimensions 50 cm × 2 cm) et équilibré avec de l'eau bi-distillée. Des aliquotes de 1 à 2 ml du concentré de l'extrait aqueux sont par la suite déposées en surface et passées à travers ce gel. L'élution est faite en mode isocratique à 25% de méthanol dans l'eau avec un débit de 1,2 ml/min. Des fractions de 5 ml sont récupérées en tubes à essai, concentrées et testées par antibiographie contre *Saccharomyces cerevisiae* pour détecter les fractions actives.

1.4.4.- Purification par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée comme dernière étape de purification des substances antilevuriennes. L'appareil de type Waters, comprend un contrôleur 600, une pompe 600 à 4 voies, un détecteur UV 2487 et un enregistreur Linear. La colonne contient une phase inverse C18 (250 mm × 7,8 mm UP ODS, granulométrie 5 µm). Elle est précédée d'une pré-colonne contenant la même phase stationnaire. La phase mobile est un mélange d'eau et de méthanol. Le programme utilisé consiste en un gradient linéaire continu de 0 à 15% MeOH-eau pendant 20 min (débit 0,6 ml/min) puis en mode isocratique à 25% MeOH-eau (débit 1,5 ml/min). La détection en UV est faite à 220 nm. Ces conditions de purification ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires. Les différentes fractions récoltées séparément sont concentrées puis testées par antibiographie. La purification finale est obtenue après 3 ré-injections.

1.5.- Études physico-chimique et spectroscopiques

1.5.1.- Test de thermostabilité

La concentration de l'extrait aqueux au rotavapeur est une étape indispensable pour la réalisation des purifications ultérieures des composés antilevuriens. Cette concentration s'avère difficile sans augmentation de la température du bain-marie. Il est donc testé l'activité de l'extrait après traitement à différentes températures. Des aliquotes de 5 ml d'extrait aqueux actif, sont soumises aux traitements thermiques suivants: 45°C, 50°C, 75°C et 100°C pendant 60 min, et 120°C (à l'autoclave) pendant 30 min. Les échantillons sont laissés refroidir à la température ambiante et testés ensuite pour leur activité antilevurienne par la méthode de diffusion des puits contre *Saccharomyces cerevisiae*. Un échantillon témoin maintenu à la température du laboratoire (25°C) est testé en même temps que les échantillons traités.

1.5.2.- Test de solubilité

La solubilité des antibiotiques antilevuriens est étudiée dans plusieurs solvants: acétone, *n*-propanol, acétonitrile, diméthylsulfoxyde (DMSO), éthanol, méthanol et eau. Des aliquotes de 5 ml d'extrait aqueux sont réparties dans des piluliers et évaporées à sec. Cinq millilitres (5 ml) de solvant sont ajoutés dans chaque pilulier. Chaque échantillon est testé pour son activité antilevurienne par la méthode de diffusion des puits contre *Saccharomyces cerevisiae*.

1.5.3.- Révélation chimiques

Les antibiotiques, après purification, sont révélés par des réactifs pour avoir une idée sur leur nature chimique. Ces révélations ont été effectuées sur des plaques de chromatographie sur couche mince de gel de silice G60 (Merck), où les antibiotiques sont d'abord spotés puis développés dans le système de solvants «éthanol-ammoniaque-eau» (E.A.E., 80:10:10, v/v/v).

Les révélateurs utilisés [33] sont: la ninhydrine (révélateur des fonctions amines), le naphtrésorcinol-H₂SO₄ (révélateur des glucides), l'ansaldéhyde-H₂SO₄ (révélateur des glucides, des stéroïdes et des terpènes), la vanilline-H₂SO₄ (révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées), le chlorure de fer ferrique (révélateur des phénols) et le formaldéhyde-H₂SO₄ (révélateur des composés aromatiques polycycliques). Les taches colorées peuvent apparaître à froid ou parfois à chaud (5 min à 100°C).

1.5.4.- Analyses spectroscopiques

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 20 entre les longueurs d'ondes 200 et 500 nm. Les spectres infrarouges (IR) ont été obtenus avec un spectromètre modèle Shimadzu IR 470, entre 400 et 4000 cm⁻¹. Les masses sont déterminées avec un spectromètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San Jose, CA) par "Nano-Electrospray Ionisation" (Nano-ESI-IT-MS). L'analyse est réalisée en modes positif et négatif. Le programme d'analyse utilisé est Xcalibur 1.2 de ThermoDuest (San Jose, USA).

2.- Résultats et discussion

2.1.- Mise en évidence de l'activité antilevurienne par la méthode des stries croisées

Les résultats de l'activité antibiotique par la méthode des stries croisées sont présentés dans le tableau I. La souche Sg163 présente une forte activité contre toutes les souches de levures testées. L'activité est particulièrement importante contre *Candida albicans* IPA 224 pathogène pour l'Homme, ainsi que contre *Saccharomyces cerevisiae*.

Tableau I.- Activité antilevurienne de la souche Sg163 de *Streptosporangium* sp. par la méthode des stries croisées (*: Moyenne des 3 répétitions)

Levures-cibles	Distance d'inhibition (mm)*
<i>Candida albicans</i> IPA 200	10
<i>Candida albicans</i> IPA 224	19
<i>Kluyveromyces lactis</i> K231	13
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> R254	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	34

2.2.- Etude de la production des antibiotiques en milieux de culture agités

2.2.1.- Production en milieux de culture complexes

Afin de choisir le milieu de production optimale, des milieux de culture complexes préconisés pour la production d'antibiotiques, sont testés. Les résultats sont présentés sur la figure 1. L'activité antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*) est observée sur tous les milieux testés. Cependant, cette activité est nettement meilleure dans le milieu ISP2. Le milieu ISP4 a globalement fourni les résultats les plus faibles.

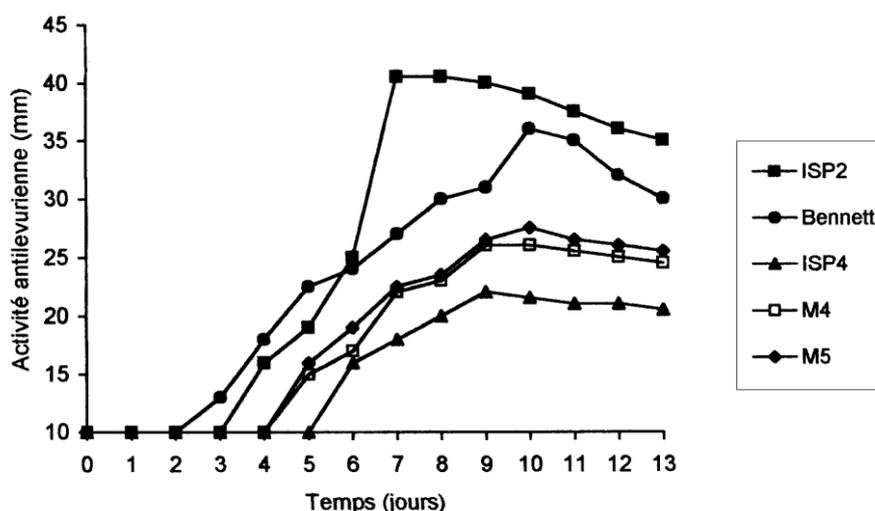


Figure 1.- Activité antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*) de la souche Sg163 en milieux de culture complexes (fioles d'Erlenmeyer de 500 ml, 250 rpm, 30°C)

L'activité antilevurienne est mesurée par la méthode de diffusion des puits. Le diamètre du puits qui est de 10 mm est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition.

Le milieu ISP2 est suivi du milieu Bennett, puis des milieux M5 de OMURA *et al.* (1968) [23] et M4 de GILPIN *et al.* (2004b) [22] qui ont donné des résultats pratiquement similaires. Les milieux ISP2, Bennett et M5 contiennent du glucose comme source de carbone. Le milieu M4 contient du glycérol. Le milieu Bennett contient 10 g de glucose, tout comme l'ISP2. Le milieu M5 contient 20g de glucose. Cette source de carbone rapidement assimilable est connue comme étant un excellent stimulant de la croissance microbienne [34], et sa concentration est déterminante pour la production des antibiotiques. En effet, pour de nombreux microorganismes, elle exerce à haute concentration, une action négative sur la synthèse d'antibiotiques (répression catabolique glucidique ou effet glucose). Plusieurs auteurs ont rapporté que les fortes concentrations en glucose ou d'autres sources carbonées facilement assimilables sont généralement défavorables à la production [35,36,37,34]. Dans notre cas, il semble que les antibiotiques de la souche Sg163 ne soient pas soumis à cette répression catabolique (du moins, aux concentrations de glucides utilisées).

Les résultats de ces cinétiques ont permis de sélectionner le milieu ISP2 comme milieu de production pour la suite du travail.

2.2.3.- Cinétique de production en milieu ISP2

Au cours de la culture en milieu ISP2, la croissance (poids sec de la biomasse), la production d'antibiotiques (méthode de diffusion des puits) et le pH sont mesurés quotidiennement pendant 13 jours. Leur évolution au cours du temps est présentée dans la figure 2.

L'activité antilevurienne est détectée le 3^{ème} jour de culture. Elle atteint son maximum le 7^{ème} jour (40 mm) puis décline progressivement jusqu'au 13^{ème} jour. Cette activité évolue en corrélation avec la croissance. De légères variations du pH sont enregistrées avec un maximum (pH 8,6) atteint le 8^{ème} jour de culture.

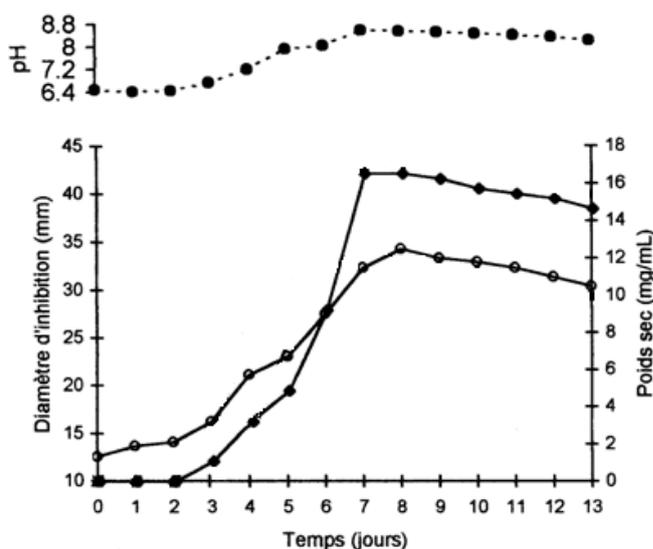


Figure 2.- Cinétique de croissance et activité antifongique en milieu ISP2, en fioles d'Erlenmeyer (500 ml, 250 rpm, 30°C) [L'activité antilevurienne est mesurée par la méthode de diffusion des puits. Le diamètre d'inhibition comprend celui du puits qui est de 10 mm. ◆ : activité antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*); ○ : poids sec; ● : pH]

A l'issue de cette cinétique, des cultures de production sont réalisées dans le milieu ISP2. Le 7^{ème} jour, les cultures sont arrêtées pour faire les extractions.

2.3.- Extraction et purification des antibiotiques

2.3.1.- Extraction

L'extraction liquide-liquide en ampoules à décanter et à partir du filtrat de culture est effectuée avec 4 solvants organiques de polarités différentes (*n*-hexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane, *n*-butanol). Les phases organiques et aqueuses recueillies séparément sont testées contre la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Aucun extrait organique n'est actif contre la levure dont l'activité reste présente dans la phase aqueuse. Celle-ci obtenue après extraction au *n*-butanol, présente une activité antilevurienne de 36 mm contre *Saccharomyces cerevisiae*.

Même si l'activité antilevurienne n'est pas extractible par le *n*-butanol, celui-ci permet déjà d'éliminer le maximum d'impuretés. La phase aqueuse, qui constitue l'extrait brut, est traitée au charbon actif afin d'éliminer les pigments bruns inactifs. Cet extrait brut a été testé contre d'autres microorganismes (résultats non présentés) englobant des moisissures (*Umbelopsis ramanniana* et *Fusarium culmorum*) et des bactéries (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia marcescens*) et il s'est avéré inactif. Il est donc strictement antilevurien.

2.3.2.- Purification

La purification de l'antibiotique antilevurien est d'abord effectuée par chromatographie sur colonne puis par HPLC.

La semi-purification de l'extrait aqueux antilevurien est réalisée avec le gel de Séphadex LH-20. La phase aqueuse obtenue après extraction du filtrat de culture au *n*-butanol, est concentrée au rotavapeur et récupérée dans un minimum d'eau pure. L'élution est faite en mode isocratique à 25% de méthanol dans l'eau. Les couleurs, les temps de rétention et l'aspect des fractions (trouble ou solution claire) ainsi que les activités (contre la levure *Saccharomyces cerevisiae*) sont notés. Cinq bandes de couleurs différentes sont obtenues, dont trois, BJ1, JP et BJ2, sont actives contre *S. cerevisiae*. Les résultats des activités des différentes bandes sont présentés dans le tableau II.

Tableau II.- Activités contre *Saccharomyces cerevisiae* des différentes bandes obtenues par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex LH-20 (isocratique à 25% de MeOH-eau)

Tubes assemblés (numéros)	Couleur (désignation)	Diamètre d'inhibition (mm)
1 à 3	Incolore (NC1)	0
4 à 7	Brun jaunâtre (BJ1)	30
8 à 11	Jaune pâle (JP)	34
12 à 15	Brun jaunâtre (BJ2)	42
16 à 20	Incolore (NC2)	0

Note. Antibiographie par la méthode des puits (8 mm de diamètre, 100 µl/puits). Le diamètre du puits est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition.

Les fractions actives semi-pures BJ1, JP et BJ2 sont purifiées par HPLC en utilisant la colonne C18. Le programme utilisé consiste en un gradient linéaire continu de 0 à 15% MeOH-eau pendant 20 min (débit 0,6 ml/min) puis en mode isocratique à 25% MeOH-eau (débit 1,5 ml/min). Les 3 fractions actives BJ1, JP et BJ2 sont en fait des complexes d'antibiotiques. Six pics actifs (notés A, B, C, G, H et I) sont obtenus pour BJ1, 2 pour JP (notés JP1 et JP2) et 9 pour BJ2 (numérotés de BJ2-1 à BJ2-9) (fig. 3). Du fait des difficultés à purifier tous ces antibiotiques hydrophiles par HPLC, il est poursuivi la purification pour les 4 antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8.

2.4.- Analyses physico-chimique des antibiotiques antilevuriens

2.4.1.- Stabilité à la température

L'étude de la stabilité de l'activité antilevurienne globale à différents traitements thermiques est indispensable vu que l'activité se trouve dans la phase aqueuse et sa concentration au rotavapeur est très longue à faible température. La stabilité de l'activité dans les échantillons soumis aux traitements thermiques et dans l'échantillon témoin, est évaluée par la méthode de diffusion des puits (mesure des diamètres d'inhibition contre la levure *Saccharomyces cerevisiae*). Les résultats montrent que l'activité reste parfaitement stable pendant 1h à 45°C, 50°C et 75°C (23,5 mm; 23,5; 23,5 mm de diamètre d'inhibition), et ce en comparaison au témoin non traité (24 mm). Même après chauffage à 100°C (1h) ou 120°C (30 min), l'activité reste très appréciable (21,5 et 18,5 respectivement).

2.4.2.- Solubilité

La solubilité de l'activité antilevurienne dans différents solvants est également évaluée par la méthode de diffusion des puits (mesure des diamètres d'inhibition contre la levure *Saccharomyces cerevisiae*). Les résultats montrent que les antibiotiques sont très solubles dans l'eau (23 mm), moyennement solubles dans le diméthylsulfoxyde (17 mm) et faiblement solubles dans le méthanol (9,5 mm). L'activité est insoluble dans les autres solvants testés (acétone, *n*-propanol et acétonitrile).

2.4.3.- Révélations chimiques

Les antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8 ont présenté dans le système de solvant E.A.E. un même R_f (rapport frontal) qui est de R_f 0,14.

Les antibiotiques ont tous donné des réactions positives avec la ninhydrine (révéléateur des amines), le naphthorésorcinol (révéléateur des glucides) et la vanilline-H₂SO₄ (révéléateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées). Les réactions sont par contre négatives avec le formaldéhyde-H₂SO₄ (révéléateur des aromatiques polycycliques), le chlorure de fer ferrique (révéléateurs des phénols et des acides hydroxamiques) et la nitro-4-aniline (révéléateur des phénols). Ces résultats suggèrent que ces antibiotiques possèdent dans leur structure un à plusieurs sucres (naphthorésorcinol-H₂SO₄ +), des amines (ninhydrine +), des groupements hydroxyles avec possibilité de liaisons éther (vanilline-H₂SO₄ +).

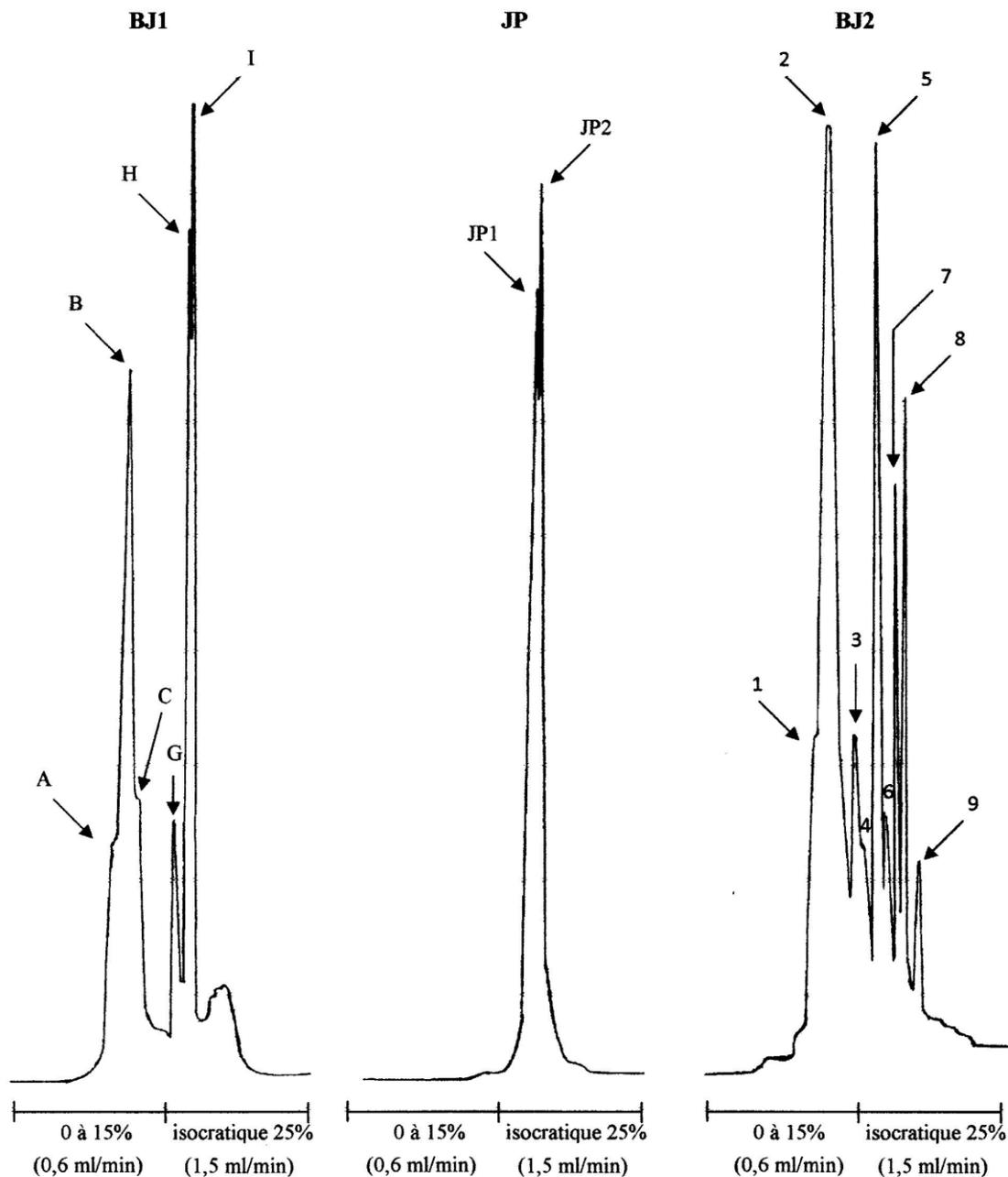


Figure 3.- Profils d'élution en HPLC des premières injections des fractions actives BJ1, JP et BJ2 solubilisées dans de l'eau

2.5.- Analyses spectroscopiques

2.5.1.- Analyse par spectrophotométrie UV-visible

Le spectre UV-visible de l'extrait brut actif (fig. 4) montre des maxima d'absorption à 214 et 248 nm. Ce spectre n'a pas montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes (absence des 3 maxima d'absorption entre 260 et 405 nm). Les antibiotiques présents dans cet extrait ne sont donc pas polyéniques. Les polyènes sont

connus pour leur toxicité et leur instabilité et sont de ce fait écartés des programmes de recherche de nouvelles molécules antifongiques.

Les antibiotiques purifiés présentent des spectres qui absorbent entre 214 et 220 nm. Ceci suggère que l'on est en présence de produits totalement saturés (pas d'absorption dans l'UV).

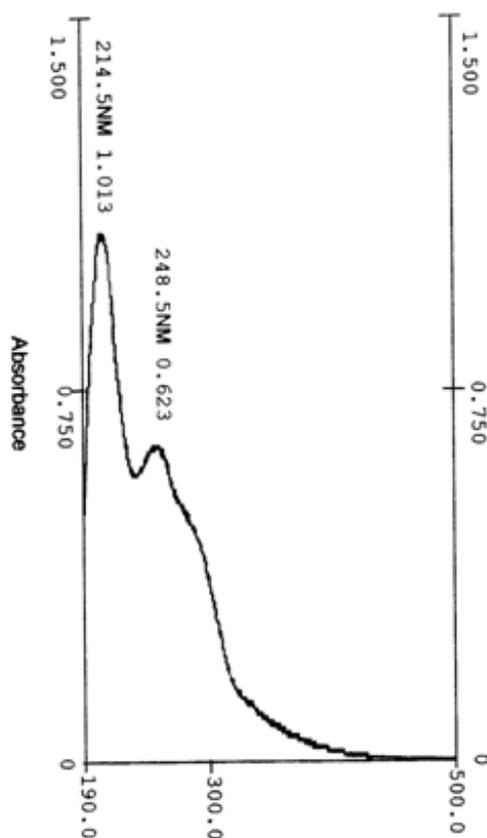


Figure 4.- Spectre UV-visible de l'extrait aqueux brut

2.5.2.- Spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge des antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8 sont similaires entre eux, ce qui indique des structures très proches. Ils présentent des bandes d'absorption à 3400 et 3200 cm^{-1} indiquant la présence de fonctions OH et NH_2 , et détectées déjà par les révélations chimiques. Ces fonctions sont confirmées par d'autres bandes à 1620~1645 cm^{-1} , 1400, 1180, 1065, 1150 et 1025 cm^{-1} . Les bandes à 2850 et à 1480 cm^{-1} montrent la présence de groupements CH du CH, du CH_2 et/ou du CH_3 . Ces résultats confirment ceux des révélations chimiques qui indiquent la présence de fonctions OH et NH_2 , des groupements CH_3 , CH_2 et/ou CH et des liaisons éther. Ces données suggèrent très fortement que les antibiotiques antilevuriens sont à classer parmi les aminoglycosides. Ces derniers sont des composés basiques fortement polaires et polycationiques dont la structure moléculaire est caractérisée par 2 ou 3 sucres aminés ou plus (groupements aminés et également hydroxyles) attachés par une liaison glycosidique à un noyau aminocyclitol [38,39]. Ils sont hydrosolubles (163A n'étant soluble que dans l'eau et le diméthylsulfoxyde).

2.5.3.- Spectrométrie de masse

Les poids moléculaires des antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8 sont de 340, 358, 458 et 396 respectivement. Au vu de leurs poids assez réduits, nos antibiotiques ne contiendraient que deux ou trois sucres aminés.

Les spectres de masse des antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8 présentent souvent en commun les fragments correspondant aux m/z 359, 339, 297, 275-277, 235, 195, 179, 162, 153 et 117. Ces molécules sont donc très proches entre elles du point de vue structure chimique. Elles contiendraient probablement de la glucosamine ($M= 179$) et peut être aussi de la désoxystreptamine ($M= 162$) comme noyau aminocyclitol.

Les aminoglycosides sont principalement produits par le genre *Streptomyces*. Ils sont également sécrétés par le genre *Micromonospora*, et plus rarement par *Dactylosporangium* et *Nocardia*. Les *Streptosporangium* ne sont pas connus pour la production de ce groupe d'antibiotiques. De plus, ils sont souvent produits par les microorganismes sous forme de complexes dont les composés sont très proches entre eux [39], comme c'est le cas de nos molécules.

La grande majorité des aminoglycosides possèdent une activité contre les bactéries à Gram positif et négatif [40,41,42]. Certains sont antifongiques. Les antibiotiques de 163A possèdent une activité strictement antilevurienne. Ils sont inactifs contre les bactéries et les moisissures testés. Les souches du genre *Streptosporangium* sont connus pour produire des antibiotiques de différentes familles chimiques (anthracyclines, angucyclines, nucléosides, macrolides) et ayant différentes activités biologiques: antibactériennes, antifongiques, antilevuriennes, antitumorales, insecticides, herbicides, inhibiteurs d'enzymes, promoteurs de croissance, etc. [43], mais la production d'aminoglycosides n'a jamais été signalée chez ce genre.

Dans la littérature, seules deux molécules aminoglycosidiques produites par deux souches de *Streptomyces* possèdent une activité antilevurienne; mais elles sont différentes de nos antibiotiques par leurs masses. Le premier antibiotique H-537-SY2 est, comme nos antibiotiques, exclusivement antilevurien [44] mais son poids moléculaire est de 507. Le second, RH-5012-C est différent de nos antibiotiques par sa masse ($M= 527$) et par son activité qui est non seulement antilevurienne, mais aussi antibactérienne.

En considérant leur poids moléculaire, nos antibiotiques BJ1-B ($M= 340$), BJ1-G ($M= 358$) JP2 ($M= 458$) et BJ2-8 ($M= 396$) sont différents par leur masse des aminoglycosides cités dans la littérature [39,40,45]. Les molécules les plus proches sont la fortimicine B ($M= 349$) proche de BJ1-B et cinq molécules proches de JP2. Il s'agit des gentamicines A2 et C3 ($M= 455$ et 463 respectivement), de la mutamicine 4 ($M= 463$) et des seldomycines 1 et 3 ($M= 454$ et 453 respectivement). Ces six molécules sont à activité antibactérienne uniquement.

Conclusion

Dans ce travail, il est étudié l'activité antilevurienne d'une souche d'actinobactérie du genre *Streptosporangium* isolée d'un échantillon de sol de la palmeraie d'Adrar. Cette activité est importante contre les souches de levure *Candida albicans*.

Il est d'abord recherché le milieu de culture permettant une production optimale de l'activité antibiotique. Puis, il est isolé et caractérisé partiellement les composés bioactifs. Ces derniers se sont révélés être trois complexes d'antibiotiques. La purification et les analyses spectroscopiques se sont poursuivies pour 4 molécules. Les révélations chimiques ainsi que les spectres infrarouges indiquent une structure aminoglycosidique. Les aminosides n'ont jamais été signalés chez le genre *Streptosporangium*. De par leur activité exclusivement antilevurienne et leurs masses, nos antibiotiques semblent être originaux. Cependant, des analyses supplémentaires telles que la spectroscopie de la RMN du proton et du carbone 13 sont nécessaires pour déterminer leurs structures chimiques. Des tests de toxicité envers les cellules animales sont à considérer également. Pour réaliser l'ensemble de ces analyses, il conviendrait d'optimiser la production des composés antilevuriens par la recherche des meilleures conditions de culture.

Ce travail rend compte également de l'importance des sols sahariens algériens comme source d'actinobactéries potentiellement productrices de nouveaux antibiotiques utilisables dans les domaines médical, vétérinaire et agro-alimentaire. Il conviendrait de poursuivre les investigations en examinant divers échantillons de sols sahariens dans l'espoir de découvrir de nouvelles molécules antibiotiques.

Références bibliographiques

- [1].- Alexander B.D., Johnson M.D., Pfeiffer C.D., Jimenez-Ortigosa C., Catania J., Booker R., 2013.- Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. Clin. Infect. Dis., 56 (12): 1724-1732.
- [2].- Pfaller M.A., 2012.- Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am. J. Med., 125(1 Suppl): S3-13.
- [3].- Vandeputte P., Pineau L., Larcher G., Noel T., Brethes D., Chabasse D., Bouchara J.P., 2011.- Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. Mycopathol., 171(1): 11-21.
- [4].- Geusau A., Antoniewicz L., Poitschek C., Presterl E., Willinger B., 2014.- In Vitro Susceptibility of *Candida* Isolates from Organ Transplant Recipients to Newer Antifungals. Mycopathol., 177: 143-156.
- [5].- Antoniewicz L., Relijc D., Poitschek C., Presterl E., Geusau A., 2009.- Mucosal *Candida* infection and colonisation as well as associated risk factors in solid organ transplant recipients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 28(8): 945-957.
- [6].- Gangneux J.P., Drogoul A.S., 2008.- Infections fongiques invasives: nouvelles données épidémiologiques et écologiques. Hématologie, 14: 5-11.
- [7].- Calderone A.R., Clancy J.C., 2012.- *Candida* and Candidiasis. 2^{ème} édition. Ed. ASM Press, USA, 544 p.
- [8].- Pierquin A.L., 2010.- Mycoses opportunistes et immunodépression. Thèse de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 118 p.

- [9].- Lass-Flörl C. 2009.- The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52 (3): 197-205.
- [10].- Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A., 2012.- Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Centr. Eur. J. Biol.*, 7 (3): 373-390.
- [11].- Genilloud O., Gonzales I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R., Vicente F., 2011.- Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 375-389.
- [12].- Tiwari K., Gupta R.K., 2013.- Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Crit. Rev. Microbiol.*, 39 (3): 256-294.
- [13].- Tiwari K., Gupta R.K., 2012.- Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 32 (2): 108-132.
- [14].- Genilloud O., 2014.- The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106: 173-188.
- [15].- Kurtböke D.I., 2012.- Biodiscovery from rare actinomycetes: an ecotaxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93: 1843-1852.
- [16].- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. Bennadji H., 1998.- Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Secheresse*, 9 (2): 147-153.
- [17].- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A., Mathieu F., 2013.- Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, 168: 223-230.
- [18].- Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.-P., Sabaou N., 2013.- *Actinopolyspora mzabensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63: 3787-3792.
- [19].- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., 2007.- Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *J Appl Microbiol* 103: 228-236.
- [20].- Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Labrihi A., Sabaou N., 2006.- Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, 52: 373-382.
- [21].- Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2004a.- Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, 57: 367-372.

- [22].- Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda D.P., 2004b.- *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1377-1381
- [23].- Rapilly F., 1968.- Techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyties*, 19: numéro hors série.
- [24].- Nonomura H., Ohara Y., 1969.- Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. Part 1. *J. Ferment. Technol.*, 47: 463-469.
- [25].- Hayakawa M., Nonomura H., 1987.- Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.*, 65: 501-509.
- [26].- Waksman S.A., 1945.- Microbiological antagonism and antibiotic substances. The Commonwealth Fund, New York.
- [27].- Shirling E.B., Gottlieb D., 1966.- Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 3313-3340.
- [28].- Warren H.B., Prokop J.F., Grundy W.E., 1955.- Non-synthetic media for antibiotic producing actinomycetes. *Antib. Chemother.*, 5: 6-12.
- [29].- Gilpin M.L., Fulston M., Payne D., Cramp R., Hood I., 1995.- Isolation and structure determination of two novel phenazines from a *Streptomyces* with inhibitory activity against metallo-enzymes, including metallo- β -lactamase. *J. Antibiot.*, 48: 1081-1085.
- [30].- Omura S., Eda S., Funayama S., Komiyama K., Takahashi Y., Woodruff H.B., 1989.- Studies on a novel antitumor antibiotic, phenazinomycin: taxonomy, fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.*, 42: 1037-1042.
- [31].- Ericsson J.M., Sherris J.C., 1971.- Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 217 (1): 1-90.
- [32].- Pfefferle C., Breinholt J., Gurtler H., Fiedler H.P., 1997.- 1-Hydroxy-4-methoxy-2-naphthoic acid, a herbicidal compound produced by *Streptosporangium cinnabarinum* ATCC 31213. *J. Antibiot.*, 50: 1067-1068.
- [33].- Merck E., 1975.- Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt, 149 p.
- [34].- Spížek J., Tichý P., 1995.- Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol.*, 40 (1): 43-50.
- [35].- Martin J.F., Demain A.L., 1980.- Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 44: 230-261.
- [36].- Demain A.L., Aharonowitz Y., Martin J.F., 1983.- Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. *In: Biochemistry and genetic regulation of commercially*

- important antibiotics. Ed. Vinning L.C., Addison Wesley, London, pp. 49-72.
- [37].- Larpent J.P., Sanglier J.J., 1989.- Biotechnologies des antibiotiques. Ed. Masson, Paris, 481 p.
- [38].- Thiele-Bruhn S., 2003.- Pharmaceutical antibiotic compounds in soils. A review. J. Plant Nutr. Soil Sci., 166: 145-167.
- [39].- Stead D.A., 2000.- Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. Journal of Chromatography B, 747: 69-93.
- [40].- Berdy J., Aszalos A., Mc Nitt K.L., 1987.- CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Vol XIII, Microbial metabolites, Parts 1, 2, 3, Florida, USA, CRC Press, Boca Raton.
- [41].- Bycroft B.W., 1988.- Dictionary of antibiotics and related substances. Ed. Chapman and Hall, London, 944 p.
- [42].- Buckingham J., 1997.- Dictionary of Natural Products. Ed. Chapman and Hall, CRC Press, London.
- [43].- Platas G., Pelaez F., Collado J., Martinez H., Diez M.T., 1999.- Nutritional preferences of a group of *Streptosporangium* soil isolates. J. Biosci. . Bioengineer., 88 (3): 269–275.
- [44].- Kondo H., Uehara M., Nakama S., Otani T., Nakamura S., 1976.- Antibiotic H 537 SY2, a new antiyeast antibiotic. The Journal of Antibiotics, 39(8): 847-849.
- [45].- Dictionary of Natural Products “DNP”, 2004.- Web version. Copyright © 1982-2004 Chapman and Hall CRC. (<http://www.chemnetbase.com>).